

Die Primärstruktur der Hämoglobine adulter Vögel:

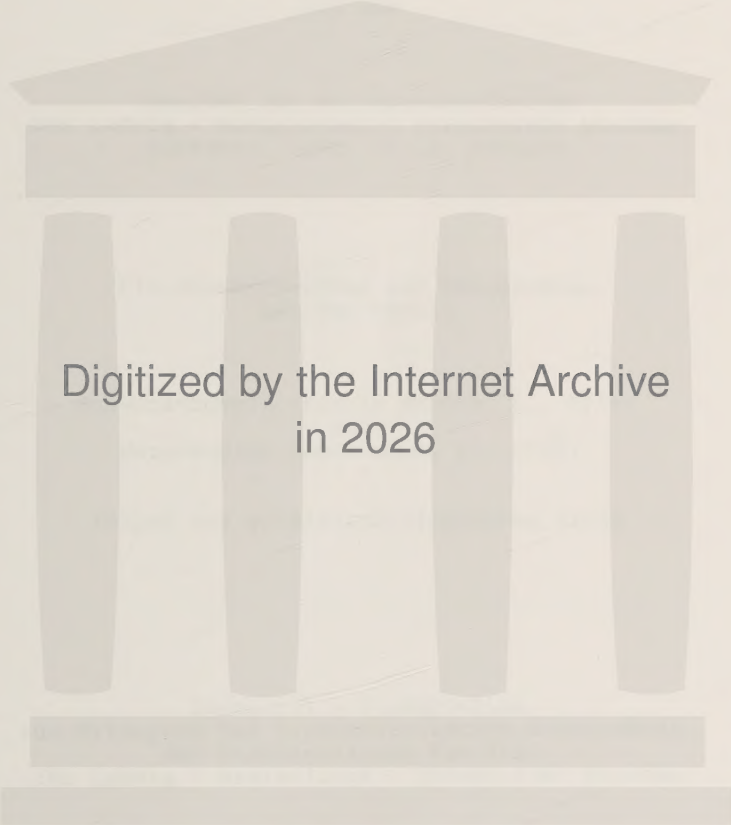
Schwarzdrossel (*Merula merula*, L., 1758)
und Mauersegler (*Apus apus*, L., 1758)

Torpor aus molekularbiologischer Sicht

Reinhard Nothum

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0105

Aus dem
Max - Planck - Institut für Biochemie
in Martinsried bei München
Abteilung Proteinchemie
Direktor: Prof. Dr. G. Braunitzer

und dem

Institut für Geflügelkrankheiten
der Ludwig - Maximilians - Universität München
Vorstand: Prof. Dr. J. Kösters

Die Primärstruktur der Hämoglobine
adulter Vögel:

Schwarzdrossel (*Merula merula*, L., 1758)
und
Mauersegler (*Apus apus*, L., 1758)

Torpor aus molekularbiologischer Sicht

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig - Maximilians - Universität München

von
Reinhard Nothum
aus
Warjasch

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. J. Kösters

Korreferent: Priv.Do. Dr. Dr.habil. W. Rambeck

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Meinen Eltern!

Abkürzungen

ATP = Adenosintriphosphat

ca. = circa

CM = Carboxymethyl

DC = Dünnschicht

DPG = 2,3 - Diphosphoglycerat

FPLC = Fast Protein Liquid Chromatography

G.G. = Graugans

GTP = Guanosintriphosphat

Hb = Hämoglobin

HPLC = Hochdruck - Flüssigkeits - Chromatographie

HU = Human

IPP = myo - Inosit - 1,3,4,5,6 - pentaphosphat

M = molar

Ma. = Mauersegler

N = normal

$P_{50} - O_2$ = Sauerstoffpartialdruck bei Halbsättigung des Hämoglobins

Pos. = Position

Quadrol = N,N,N',N' - Tetrakis(2 - hydroxypropyl)ethylendiamin

R - Struktur = Relaxed Struktur

RP = reversed phase

Sch.D. = Schwarzdrossel

T - Struktur = Tense Struktur

TFA = Trifluoressigsäure

Tp = Tryptisches Peptid

TPCK = (N - Tosyl - L - phenylalanyl)chlormethan

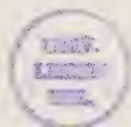
Symbolerklärung

Aminosäure	3-Buchstaben Code	1-Buchstaben Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

EINLEITUNG.....	1
I. DAS HÄMOGLOBIN.....	3
1. Allgemein.....	3
2. Die Primärstruktur des Hämoglobins.....	11
II. MATERIAL UND METHODEN.....	16
1. Gewinnung des Blutes, der Erythrozytensuspension, Hämolyse, Hämabspaltung.....	16
1.1. Blutgewinnung.....	16
1.2. Erythrozytengewinnung.....	16
1.3. Hämolyse.....	17
1.4. Hämabspaltung.....	17
2. Komponenten.....	18
2.1. Nachweis mit der vertikalen Diskgel- elektrophorese.....	18
2.2. Analytische Komponententrennung mit dem FPLC..	19
3. Kettentrennung.....	20
3.1. Nachweis mit der vertikalen Tritongel- elektrophorese.....	20
3.2. Präparativ mit der Ionenaustauscher- chromatographie.....	21



4. Sequenzbestimmung der α - und β - Ketten.....	22
4.1. Oxidation.....	22
4.2. Enzymatische Spaltung.....	23
4.3. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)...	24
4.4. Dünnschichtelektrophorese.....	25
4.5. Analysen.....	26
4.6. Aminosäuresequenzen.....	27
III. ERGEBNISSE.....	29
1. Das Hämoglobin der Schwarzdrossel.....	29
1.1. Globingewinnung.....	29
1.2. Komponententrennung.....	29
1.3. Kettentrennung.....	31
1.4. Tryptische Peptide der α^A - Ketten.....	34
1.5. Tryptische Peptide der α^D - Ketten.....	36
1.6. Tryptische Peptide der β - Ketten.....	40
Bruttotabellen.....	43
Sequenztabellen.....	46
2. Das Hämoglobin des Mauerseglers.....	48
2.1. Globingewinnung.....	48
2.2. Komponententrennung.....	48
3.2. Kettentrennung.....	51
3.3. Tryptische Peptide der α^A - Ketten.....	54
3.4. Tryptische Peptide der α^D - Ketten.....	56
3.5. Tryptische Peptide der β - Ketten.....	58
Bruttotabellen.....	61

Sequenztabellen.....	64
IV. DISKUSSION.....	66
1. Schwarzdrossel.....	66
1.1. Biologie der Schwarzdrossel.....	66
1.2. Sequenz der Ketten.....	68
1.2.1. Phosphatbindungsstellen.....	69
1.2.2. Hämbindungsstellen.....	70
1.2.3. $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstellen.....	72
1.2.4. $\alpha_1\beta_2$ - Bindungsstellen.....	78
2. Mauersegler.....	81
2.1. Biologie des Mauerseglers.....	81
2.2. Kettensequenzen.....	84
2.2.1. Phosphatbindungsstellen.....	84
2.2.2. Hämbindungsstellen.....	84
2.2.3. $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstellen.....	85
2.2.4. $\alpha_1\beta_2$ - Bindungsstellen.....	93
3. Molekulare Grundlagen der Anpassung an extreme Umweltbedingungen.....	94
V. ZUSAMMENFASSUNG.....	98
VI. LITERATUR.....	101

EINLEITUNG

Auf unserer Erde leben 4 - 5 Millionen verschiedene Organismen (Dobzhansky et al. 1977), die einen gemeinsamen Ursprung haben.

Die Entstehung so vieler Lebensformen wird durch die Mutation ermöglicht, die Fähigkeit des genetischen Materials, sich zu verändern. Die Mutanten werden der Selektion unterworfen. Zeigt sich ihr Erbmaterial als günstiger in den gegebenen Umweltbedingungen, so werden mehr Nachkommen überleben. Dieses Erbgut wird sich in der gegebenen Population, ja später in der gesamten Spezies durchsetzen.

In der Medizin kann eine erfolgreiche Heilung nur durch Bekämpfung der Krankheitsursachen und nicht der einzelnen Symptome erzielt werden. Die Anpassung einer Art an besondere Umweltbedingungen kann auch nicht anhand einer einzigen anatomischen oder molekularbiologischen Besonderheit gedeutet werden. Vielmehr führen sehr viele, oft kleine Veränderungen, die sich summieren, zur speziellen Anpassung.

Ziel dieser Arbeit ist, die Primärstrukturen der Hämoglobine der Schwarzdrossel (*Merula merula*) und des Mauerseglers (*Apus apus*) aufzuklären. Beide Vögel besitzen die Fähigkeit, bei niedrigen Temperaturen und bei Nahrungsmangel, ihre Körpertemperatur zu senken. So wird der Stoffwechsel gedrosselt und Energie eingespart. Die Schwarzdrossel zeigt dieses Phänomen in abgeschwächter Form, sie kann ihre Körpertemperatur um maximal $4,5^{\circ}\text{C}$ senken (Hypothermie) (Biebach 1977).

Der Mauersegler, ein hochspezialisierter Insektenjäger, senkt seine Körpertemperatur um maximal 21°C , er fällt in Torpor (Koskiemes 1948, 1950, Weitnauer 1983). In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die extreme Anpassung auch durch Modifikation der Primärstruktur des Hämoglobins erleichtert wird.

I. Das Hämoglobin

1. Allgemein

Einzeller und Lebewesen bis zu 1 mm können allein durch Diffusion ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden. Insekten entwickelten hohle Trachealrohre, welche ebenfalls einen direkten Gasaustausch mit der Zelle durch Diffusion erlauben (Dickerson, Geis 1983, Scheer 1969, Marshall et al. 1973).

Schon auf relativ niedriger Evolutionsstufe haben Lebewesen verschiedene Wege gefunden, ihre Sauerstoffversorgung zu verbessern, eine Voraussetzung zu höher entwickelten Lebensformen. Dies geschah mit Hilfe respiratorischer Chromoproteide:

- Hämerythrin - hat eine rote Farbe, enthält Eisen, welches jedoch nicht in einem Porphyrinring gebunden ist. Durch Oxidation wird Fe^{+2} in Fe^{+3} verwandelt.

Vorkommen: bei Sipunculiden.

- Chlorocruorin - hat eine grüne Farbe, enthält Eisen und ist dem Hämoglobin ähnlich. Eine der zwei Vinylgruppen des 4. Pyrrolringes ist durch eine Formylgruppe ersetzt.

Vorkommen: bei *Spirographis spallanzanii*

- Hämocyanin - ist von blauer Farbe, enthält Kupfer, welches durch Oxygenierung seine Wertigkeit ändert. Es findet sich frei gelöst in der Hämolymphe, nie in Zellen.

Vorkommen: Mollusken und Arthropoden (Scheer 1969, Linzen 1986).

- Myoglobin - ein rotes, Eisen enthaltendes Molekül, welches in monomerer Form in der Muskulatur vorkommt, erleichtert den O_2 - Transport innerhalb des Muskels, dient jedoch hauptsächlich seiner Speicherung (Stryer 1979). Es hat eine höhere O_2 - Affinität als das Hämoglobin, selbst im venösen Blut kann eine vollständige Sättigung erfolgen (Buddecke 1980). Seine O_2 - Bindungskurve ist hyperbolisch (Karlson 1980).

- Hämoglobin - ein rotes, Eisen enthaltendes Molekül, welches in mono - oder polymerer Form vorkommt.

Monomere Hämoglobine findet man schon bei wirbellosen Tieren, z.B. bei Larven der Gattung Chironomus (Buse et al. 1969).

Wasserflöhe sind in der Lage, unter hypoxischen Bedingungen Hämoglobin zu synthetisieren. Wenn die Sauerstoffkonzentration im Wasser steigt, hört die Hämoglobinproduktion auf (Dickerson, Geis 1983).

Wohl am erstaunlichsten ist das Vorkommen des Leghämoglobins. Es existiert in den stickstoffbindenden Wurzelknötchen der Leguminosen, nimmt den Sauerstoff auf, wahrscheinlich mit dem Zweck, den Prozess der Stickstofffixation störungsfrei zu erlauben (Dickerson, Geis 1983).

Das Flußneunauge (*Lampetra fluviatilis*), ein niederes Wirbeltier, besitzt ein monomeres Hämoglobin, welches in der Deoxyform Dimere bildet und in der Oxyform dissoziiert. Es ist eine Zwischenstufe von monomeren zu tetrameren Hämoglobinen (Rudloff et al. 1966). Wirbeltiere haben speziell adaptierte

Zellen, die Erythrozyten, entwickelt, in welchen Hämoglobin konzentriert vorkommt. So wird ein viel effizienterer Gasaustausch ermöglicht. Jede rote Blutzelle beherbergt ca. 280 Millionen Hämoglobinmoleküle (Dickerson, Geis 1983). Bei höher entwickelten Vertebraten ist Hämoglobin ein tetrameres Molekül (ca. 10.000 Atome). Viele Arbeiten wurden über seine Struktur, seine Funktion und die Zusammenhänge zwischen beiden geschrieben (Perutz 1960, 1968, 1969, 1983, Bunn 1977, Dickerson, Geis 1983, Imai 1982, Honig, Adams 1986). Hämoglobin besteht aus 4 Polypeptidketten, von denen je 2 identisch sind: $\alpha_2\beta_2$. Zusammen bilden sie ein globuläres Knäuel. Jede Polypeptidkette ist um eine prosthetische Gruppe, das Häm, gefaltet. Dies ist in allen Hämoglobinen identisch. Das Häm, Protoporphyrin IX, besteht aus einem Porphyrinring, in dessen Mitte sich ein 2 - wertiges Eisenatom befindet. Vom koordinativ 6 - wertigen Eisenatom sind 4 Koordinationsstellen von den N - Atomen der 4 Pyrrolringe besetzt. Die 5. dient der kovalenten Bindung mit der Imidazolgruppe des proximalen Histidins der Globinkette (α - Ketten: Pos. 87, β - Ketten: Pos. 92). Gleichzeitig hat Eisen eine Verbindung zum distalen Histidin (α - Ketten Pos. 58, β - Ketten Pos. 63).

Der molekulare Sauerstoff kann durch Oxygenierung reversibel an die sechste Bindungsstelle des Eisens gebunden werden.

Die Polypeptidketten unterscheiden sich durch Anordnung und Anzahl der Aminosäuren. Bei Vögeln und Säugern bestehen nur die α - Ketten aus 141, die β - Ketten aus 146 Aminosäuren. Sie sind durch Peptidbindungen linear aneinandergereiht und

bilden die Primärstruktur, welche artspezifisch ist. In Frage kommen 20 Aminosäuren, die sich durch ihre Seitenketten unterscheiden.

Die räumliche Konfiguration der Polypeptidketten, ihre spezifische Faltung in Form von α - Helices wird als Sekundärstruktur bezeichnet. Die α - Helix macht alle $5.4 \text{ \AA}$ eine vollständige Windung, welche aus 3.6 Aminosäuren besteht und durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird. Fast 80 % der Polypeptidketten des Hämoglobins zeigen diese Struktur, der Rest bildet nichthelikale Bereiche.

Die β - Ketten bestehen aus 8 helikalen Segmenten (A - H), die α - Ketten aus 7, da ihnen das D - Segment fehlt. Zwischen ihnen befinden sich nichthelikale Bereiche (AB - GH). Jede Kette beginnt mit dem nichthelikalen Bereich NA und endet mit dem nichthelikalen Bereich HC.

Die dreidimensionale Gestaltung der helikalen und nichthelikalen Bereiche erlaubt die Bildung einer globulären Struktur, der Tertiärstruktur, die bei α - und β - Ketten sehr ähnlich ist. Zwischen den einzelnen Ketten des Globins bestehen Bindungen, welche die Quarternärstruktur ergeben.

Die komplette Aufklärung der Primärstruktur eines Hämoglobins verdanken wir Prof. G. Braunitzer und seiner Arbeitsgruppe. Sie haben als erste die komplette Aminosäuresequenz des adulten Humanhämoglobins veröffentlicht (Braunitzer et al. 1961).

Tertiär - und Quarternärstruktur wurden von Prof. M.F.Perutz und seinen Mitarbeitern mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Perutz et al. 1960).

Zwischen den Aminosäuren der α und β Ketten können Wasserstoffbrücken -, Salzbrücken -, van der Waals - und andere hydrophobe Bindungen gebildet werden. Bindungen sind dort möglich, wo der Abstand zwischen den beteiligten Atomen nicht größer als $4 \text{ \AA}$ ist (Fermi et al. 1981).

Durch sehr stabile Bindungen zwischen je einer α und einer β - Kette bilden sich $\alpha_1\beta_1$ oder $\alpha_2\beta_2$ - Dimere. Diese bleiben auch während der Gestaltsänderung vom Oxy zum Deoxyhämoglobin relativ unverändert. Die α - Kette eines Dimers hat Wechselwirkungen mit der β - Kette des anderen Dimers. So entstehen die $\alpha_1\beta_2$ oder $\alpha_2\beta_1$ - Bindungen, die weniger stabil sind. Beim Übergang von der Oxy zur Deoxyform werden sie gelöst und durch neue Bindungen ersetzt (Perutz 1976). Sie spielen eine große Rolle für den reversiblen Übergang vom Oxy - (R - Struktur) zum Deoxyhämoglobin (T - Struktur).

Die Effizienz, mit welcher ein Lebewesen Sauerstoff aufnehmen und verwerten kann, hängt von mehreren Faktoren ab:

- Atmungsapparat
- Kreislaufsystem
- Myoglobingehalt der Muskulatur
- Anzahl der Erythrozyten im Blut
- Struktur des Hämoglobins
- Einfluß von Temperatur, CO_2 , H^+ , Cl^- und Phosphaten auf das Hämoglobin.

Das tetramere Hämoglobin zeigt eine sigmoide Sauerstoffbindungskurve, eine Folge der Häm - Häm - Wechselwirkungen. Die Struktur des Deoxyhämoglobins wird durch das Vorhandensein von Salzbrücken, hauptsächlich zwischen ionisierbaren Gruppen der α - Ketten, stabilisiert. Sie müssen zerstört werden, um den Übergang zu Oxyhämoglobin zu erlauben. Dies findet statt, nachdem 2 - 3 O_2 - Moleküle gebunden sind. Solange die Deoxystruktur besteht, kann O_2 schwerer aufgenommen werden, was eine niedrigere Affinität bedingt. Nachdem die Salzbrückenbindungen gelöst sind und das Hämoglobin sich in die R - Struktur verwandelt hat, kann O_2 viel leichter aufgenommen werden. Die Affinität steigt und ist identisch mit der einzelner Hämoglobinuntereinheiten. Physiologisch ist die sigmoide O_2 - Bindungskurve von großer Bedeutung. Bei hohem Partialdruck, wie er in den Lungen vorkommt, kann Hämoglobin sehr gut mit O_2 beladen werden. In den Geweben herrscht niedriger Partialdruck, die O_2 Affinität des Hämoglobins fällt, er kann leichter abgegeben werden.

Allosterische Effektoren spielen in der Affinitätsänderung ebenfalls eine wichtige Rolle: H^+ und Cl^- - Ionen, CO_2 sowie organische Phosphate verschieben die Gleichgewichtskurve nach rechts, also zu einer geringeren O_2 - Affinität.

Die bei Vertebraten vorkommenden Polyphosphate sind verschieden: Säuger überwiegend DPG, Fische ATP und GTP, Vögel vor dem Schlupf ATP und DPG, adulte Vögel IPP (Arnone 1972, 1974, Perutz et al. 1982, Perutz 1983, Petschow et al. 1977, Rollema 1979, Bartlett 1982, Rapoport et al. 1941). Die

Bindungsstellen für organische Phosphate befinden sich in den β - Ketten (Fermi et al. 1981).

In der T - Struktur wird der Spalt zwischen den β - Ketten größer. So können organische Phosphate eindringen und die Deoxystruktur stabilisieren. Deoxyhämoglobin bindet ein Molekül organisches Phosphat (1 : 1). Beim Übergang der T - zur R - Struktur verengt sich der Spalt zwischen den β Ketten. Durch die Veränderung der pK Werte der ionisierbaren Gruppen werden die Phosphate hinausgedrängt (Fermi et al. 1981, Honig, Adams 1986).

Unter Bohreffekt verstehen wir den Einfluß der H^+ - Ionen auf die O_2 - Affinität des Hämoglobins, bedingt durch ihre stabilisierende Wirkung auf die Deoxystruktur (Bohr et al. 1904). Nur ca. 10 % des vom Gewebe abgegebenen CO_2 kann direkt, durch Bildung von Carbamylgruppen mit den N - terminalen Aminogruppen abtransportiert werden. Der größte Teil des CO_2 reagiert mit H_2O , es bildet sich HCO_3^- und H^+ . Dies ist eine reversible Gleichgewichtsreaktion, welche durch Kohlensäureanhydrase katalysiert wird.

H^+ Ionen werden von Deoxyhämoglobin durch Protonierung von freien NH_2 - Gruppen gebunden und zur Lunge transportiert. Wegen der O_2 Aufnahme werden sie freigegeben, können mit HCO_3^- Ionen reagieren und $H_2O + CO_2$ bilden (Russu et al. 1986). Die T - Struktur geht durch O_2 - Aufnahme in die R - Struktur über.

Nur die Abgabe der H^+ Ionen durch das Deoxyhämoglobin erlaubt es dem CO_2 , mit H_2O zu reagieren und HCO_3^- zu bilden, welches als Puffer im Blut verwendet wird.

Die Cl^- Ionen binden mit den protonierten Aminogruppen nur in der Deoxyform, da das Netzwerk der positiven Ladungen in der Oxyform zerstört ist (Dickerson, Geis 1983).

Auch die Temperatur hat einen Einfluß auf die O_2 - Affinität des Hämoglobins. Mit steigender Temperatur fällt die Affinität, die O_2 - Abgabe wird erleichtert. Dies ist ein sinnvoller Prozess, da sich bei niedriger Temperatur die Stoffwechselvorgänge verlangsamen. Es muß nicht so viel O_2 für die Verbrennung zur Verfügung gestellt werden. Höhere Körpertemperaturen steigern den Stoffwechsel, es kann auch mehr O_2 an die Gewebe abgegeben werden (Bunn et al. 1977).

2. Die Primärstruktur des Hämoglobins

Zum besseren Verständnis der Struktur - Funktionsbeziehung ist die Kenntnis der Primärstruktur von entscheidender Bedeutung. Schon in den 50. Jahren wurde die Wichtigkeit der Primärstruktur für die Funktion des Hämoglobins bewiesen (Ingram 1956).

Beim Menschen gibt es die erblich bedingte Sichelzellanämie, die durch eine Mutation in Position β 6 hervorgerufen wird. Das normalerweise vorkommende Glu wird durch Val ersetzt. Dieser Austausch wird durch eine Einzelpunktmutation (GAU = Glu zu GAA = Val) verursacht.

Bei niedrigem O_2 - Partialdruck, wie er im Gewebe vorherrscht, kommt es zu Verformungen der roten Blutkörperchen, welche oft irreversibel geschädigt werden.

In der T - Form paßt β 6 Val eines Tetramers in die hydrophobe Tasche des EF - Segmentes eines anderen Tetramers, es werden aneinanderklebende Stränge von Hämoglobinmolekülen gebildet (Dickerson, Geis 1983). Diese Mutation konnte sich im genetischen Code einiger Populationen konservieren, da heterozygote Individuen phänotypisch gesund sind und eine Resistenz gegen Malaria aufweisen.

Heute sind ca. 600 Humanhämoglobine bekannt, die sich in einem oder mehreren Austauschen unterscheiden (Honig et al. 1986).

Genduplikationen können einen adaptativen Vorteil für die Ontogenie einer Art bringen. Der Fötus atmet unter hypoxischen Bedingungen. Durch die Notwendigkeit, ausreichend mit

O_2 versorgt zu werden, hat das fötale Hämoglobin eine höhere O_2 - Affinität als das der Mutter.

Das Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) hat identische α - Ketten mit dem beim adulten Menschen vorkommenden Hb A ($\alpha_2\beta_2$). Die γ - Ketten (Schroeder et al. 1963) unterscheiden sich in 39 Positionen von den β - Ketten. Entscheidend ist der Austausch β 143 His im Hb A durch γ 143 Ser im Hb F (Braunitzer et al. 1978), eine Phosphatbindungsstelle, die im Falle des Hb F nicht vorhanden ist. Als Folge wird die O_2 - Affinität nicht so stark herabgesetzt.

Das Überleben in großen Höhen (> 3000 m), bei geringem O_2 - Partialdruck (< 110 Torr), erfordert von Lebewesen verschiedene Anpassungsmechanismen (Heath et al. 1981).

- Akklimatisation -

Spezies, die an das Höhenleben nicht so gut angepaßt sind (z.B. der Mensch), reagieren unter hypoxischen Bedingungen mit einer Erhöhung des Hämatokrits, des Hämoglobingehaltes im Blut und einer Steigerung des DPG - Spiegels. Dieser bedingt die Verschiebung der O_2 - Bindungskurve nach rechts, die O_2 - Abgabe wird erleichtert. Eine Ausnahme bilden die Sherpas des Himalaya, die einzige menschliche Population, deren Hämoglobin in großen Höhen (3800 - 3900 m) eine Verschiebung der O_2 - Bindungskurve nach links, also erhöhte O_2 - Affinität zeigt. Der Mechanismus der ausreichenden O_2 - Abgabe an die Gewebe ist noch unklar. In diesen Höhen haben sie einen normalen Hämatokrit (Heath et al. 1981), die DPG - Konzentration ist vergleichbar mit der anderer Populationen auf Meereshöhe (Morpurgo et al. 1976). Sherpas sind ein

Beispiel partieller Adaptation an extreme Umweltbedingungen, in denen sie seit ca. einer halben Million Jahren leben (Heath et al. 1981). Die Primärstruktur des Hämoglobins ist identisch mit der anderer Menschen.

- Adaptation - genetische Mechanismen

Spezies, die an das Leben in extremen Höhen sehr gut angepaßt sind, haben neben anatomischen Besonderheiten auch molekularbiologische Mechanismen entwickelt, welche die O_2 - Affinität des Hämoglobins erhöhen. Lama (*Lama glama*), Alpaka (*Lama pacos*) und Vikunja (*Lama vicungna*), Bewohner der Hochplateaus Südamerikas (4000 - 6000 m), haben in Position β 2 ein Asn (Braunitzer et al. 1977). Ist diese Stelle von His oder Gln besetzt, kann eine Wasserstoffbrücke zwischen Phosphat und Seitenkette ausgebildet werden (Phosphatbindungsstelle), im Falle des Asn ist diese zu kurz.

Hämoglobine des indischen (*Elephas maximus*) und afrikanischen Elefanten (*Loxodonta africana*) (Braunitzer et al. 1982, 1984), des Rhinoceros (*Ceratotherium simum*) (Masur et al. 1982) und des Gürteltieres (*Dasypus novemlineatus*) (Kleinschmidt et al. 1982) haben auch in Position β 2 ein Asn, sind jedoch Flachlandbewohner. Ihr Hämoglobin hat eine hohe O_2 - Affinität, genetische Basis zum Überleben in großen Höhen.

Vögel sind die artenreichste Klasse der Vertebraten, mit ca. 9000 Arten (Wolters 1975 - 1982). Einige leben zeitweise oder immer in sehr großen Höhen, was anatomische und physiologische Anpassungsmechanismen voraussetzt. Streifengänse

(*Anser indicus*) ziehen im Herbst aus ihren Brutgebieten in Tibet über die höchsten Gipfel des Himalaya in Höhen von mehr als 8000 m nach Indien (Swan 1970), Andengänse (*Chloephaga melanoptera*) leben permanent auf den Hochplateaus der Anden in Höhen von 6000 m (Hall et al. 1936). Ein Sperbergeier (*Gyps rueppelii*) geriet in Höhen von über 11.000 m in das Triebwerk eines Flugzeuges, der bisher bekannte Höhenrekord eines Lebewesens (Layborne 1974).

Diese Vögel besitzen ein Hämoglobin mit hoher O_2 - Affinität. Für das Verständnis der molekularbiologischen Deutung dieser Eigenschaft, war die Aufklärung der Primärstruktur von Bedeutung.

Die Hämoglobine der bis heute sequenzierten Vögel bestehen aus zwei (Kleinschmidt, Sgouros 1987), selten aus einer (Godovac - Zimmermann, Braunitzer 1984, 1985) oder mehreren (Hiebl 1987) Komponenten. Die Streifengans hat 2 Hämoglobinkomponenten: Hb A zu 90 %, Hb D zu 10 % (Hiebl 1987). Im Hb A wurde in Position α^A 119 Ala gefunden (Oberthür et al. 1982). Bei allen bis heute sequenzierten Vogelarten ist α^A 119 Pro, eine $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstelle, welche durch van der Waals Kräfte mit β 55 Leu die T - Struktur stabilisiert (Perutz 1983). Mit α^A 119 Ala fällt diese Wechselwirkung wegen der zu kurzen Seitenkette weg, das Gleichgewicht wird Richtung R - Struktur verlagert (Hiebl 1987).

Der Verlust desselben Kontaktes ist im Hämoglobin der Andengans anzutreffen. Hb A und Hb D haben in Position β 55 Ser, eine hydrophile Aminosäure, welche bei anderen Vögeln durch β 55 Ile oder Leu, hydrophobe Aminosäuren, ersetzt ist. Ser

unterbricht die Wechselwirkung zwischen β 55 und α^A oder α^D 119 Pro. Die Oxystruktur wird stabilisiert, was eine erhöhte O_2 - Affinität bedingt. Die Abgabe könnte durch ein angepaßtes Myoglobin verbessert werden (Hiebl 1987).

Der Sperbergeier hat 4 Hämoglobine:

- 2 Hauptkomponenten: Hb A + Hb A'
- 2 Nebekomponenten: Hb D + Hb D'

Es wurde die Theorie der affinitätskontrollierten Kaskade postuliert (Hiebl 1987): Hb D und Hb D' sind hochaffin, nehmen O_2 aus der hypoxischen Umgebung auf, geben ihn an das mittelaaffine Hb A' ab, dieses an das niedrigaffine Hb A, welches ausreichende Gewebesättigung gewährleistet.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Gewinnung des Blutes, der Erythrozytensuspension, Hämolyse, Hämabspaltung.

1.1. Blutgewinnung

Das Blut wurde mehreren Individuen der Art Schwarzdrossel (*Merula merula*) im Institut für Geflügelkrankheiten der tierärztlichen Fakultät der L.M.U. München, Oberschleißheim, aus der Vena jugularis entnommen. Zur Verhinderung der Koagulation wurde dem Blut Heparin (Vetren^R 200 Heparin - Natrium), in einem Verhältnis von 10 % zugefügt. Die Blutentnahme beim Mauersegler (*Apus apus*) erfolgte in derselben Weise.

1.2. Erythrozytengewinnung

Nach der Zentrifugation des Blutes in Eppendorfhütchen (12000g, 4 min), wurde das überstehende Plasma entfernt, die Erythrozyten 3 x mit physiologischer NaCl - Lösung (0,9 M NaCl) gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die so gereinigten Erythrozyten bei einer Temperatur von - 68°C aufbewahrt.

1.3. Hämolyse

Die aufgetauten Erythrozyten wurden mit dem doppelten Volumen Aqua bidest. versetzt, 4 x wiederholt eingefroren, aufgetaut und 1 h bei + 4°C gelagert. Das in das hypotone Medium ausgetretene Hämoglobin wurde durch Zentrifugation (12000g) von den Zellmembranen und Zellkernen abgetrennt, abgezogen und in Eppendorfhütchen überführt. Der Rückstand wurde 4 x mit Aqua bidest. zur Entfernung des anhaftenden Hämoglobins nachgewaschen, zentrifugiert und der Überstand in Eppendorfhütchen aufbewahrt.

1.4. Hämabspaltung

Zur Gewinnung des Globins kam die Methode von Rossi - Fanelli et al. (1958) zur Anwendung. Die Hämoglobininlösung wurde tropfenweise, unter stetigem Rühren in salzsaures Aceton (990 ml Aceton zur Analyse + 10 ml 37 % HCl Lösung), welches mit Trockeneis auf eine Temperatur von - 18°C gekühlt war, eingetropf. Das Globin fällt als flockiger, weißer Niederschlag aus, das Häm bleibt in Lösung. Nach 30 minütigem Ruhen im Kühlraum (ca. 0°C) wurde das überstehende, braune, Häm enthaltende Aceton abgesogen und verworfen. Das Globin wurde mehrmals mit kaltem Aceton gewaschen und abzentrifugiert, anschließend in 60 ml Aqua bidest. gelöst. Zur Entfernung des restlichen Acetons konnte es mittels Rotationsverdampfer eingeengt und anschließend lyophilisiert werden. Die Aufbewahrung des Globins erfolgte bei Raumtemperatur.

2. Komponenten

2.1. Nachweis mit der vertikalen Diskgelelektrophorese

Verwendet wurden Polyacrylamidrundgele (0,5 x 7,5 cm).

In Anlehnung an das von Davis (1964) beschriebene Verfahren konnte eine Trennung nach Ladung, Größe und Gestalt der Moleküle unter nicht dissoziierenden Bedingungen im alkalischen pH Bereich erzielt werden. Die Anzahl der Hämoglobin-komponenten konnte ermittelt werden.

Zusammensetzung der Gele:

10 % Acrylamid - Bisacrylamid

0,4 M Tris / HCl - Puffer pH 8,9

Elektrophoresepuffer:

0,07 M Tris / Glycin - Puffer pH 8,3

Die Hämoglobinproben (15 - 45 µg), mit Saccharose beschwert, wurden auf die in der Elektrophoresekommer befindlichen Rundgele aufgetragen und der Kathodenraum nachträglich mit Elektrophoresepuffer gefüllt.

Nach sechsminütigem Konzentrieren (1 mA / Röhrchen) lief die Elektrophorese 65 Minuten mit 4,5 mA / Gel.

Die Proteinbanden konnten mit 1 %. Amidoschwarz - (10B) - Lösung in 7 %. Essigsäure in 10 Minuten angefärbt und fixiert werden, der überschüssige Farbstoff wurde mit 7 %. Essigsäure entfernt.

2.2. Analytische Komponententrennung mit dem FPLC.

Verwendet wurde eine Glas Pac TSK SP - 5 PW - Säule (8 x 75 mm, LKB - Produkter AB 2133 - 510, Bromma, Schweden) mit Sulphopropylgruppen als starkem Kationenaustauscher.

Verwendete Apparatur:

Zweikolbenpumpe (2150 HPLC Pump, LKB)

Controller (2152 LC Controller, LKB)

Photometer (UV Detector BT 3030, Biotronik)

Schreiber (C R2 AX, Shimadzu)

Das LKB Ultrochrom GTi Bioseparation System für FPLC hat Leitungen aus Titanlegierungen und inerten Polymeren.

Verwendete Puffer: A. 0,01 M NaH_2PO_4 pH 4,91

0,01 M Na_2HPO_4 pH 9,64

Durch Mischung konnte ein optimaler pH für die Trennung gefunden werden: pH 7,0

B. 0,01 M NaH_2PO_4 + 1 M NaCl

mit 0,01 M Na_2HPO_4 + 1 M NaCl

bis pH 7,0 titriert.

Durchflußgeschwindigkeit: 0,5 ml / min

Detektion: 280 nm oder 410 nm.

3. Kettentrennung

3.1. Nachweis mit der vertikalen Tritongeleelektrophorese.

Verwendet wurden Polyacrylamidrundgele (0,5 x 7,5 cm).

Die Trennung der Globinketten erfolgte unter denaturierenden Bedingungen nach Ladung, Größe, und hydrophobem Charakter nach der Methode von Rovera et al. (1978), die der Identifizierung und Reinheitsprüfung der Globinketten dient.

Zusammensetzung der Gele:

12 % Acrylamid - Bisacrylamid
2 % Triton X 100
0,5 % N,N' Tetramethyldiamin
8 M Harnstoff
5 %. Essigsäure

Elektrophoresepuffer:

5 %. Essigsäure

Probenpuffer:

8 M Harnstoff
8 %. Essigsäure
8 %. Mercaptoethanol

Zur Reinigung der Gele wurde eine Vorelektrophorese 1 h bei 200 V durchgeführt, der Elektrophoresepuffer erneuert, 15 - 45 µg Globin in 15 - 45 µl Probepuffer gelöst und auf die Gele aufgetragen. Die Elektrophorese dauerte 3 h 30 min bei 140 V.

Färben und entfärben wie in II.2.1. beschrieben.

3.2. Präparativ mit der Ionenaustauscherchromatographie.

Als Füllmaterial wurde CM - 52 Cellulose (Whatman - Preswollen), ein Kationenaustauscher, verwendet. Die Methode ist von Clegg et al. (1966) beschrieben worden.

Säule: 2,5 x 14 cm
Carboxymethylcellulose CM - 52

Puffer: 8 M Harnstoff
0,02 M Natriumacetat
0,01 % 1,4 - Dithioerythrit
mit Essigsäure ad pH 5,5

Gradient A : linear
500 ml Startpuffer + 0,02 M NaCl
500 ml Startpuffer + 0,10 M NaCl

Gradient B : linear
500 ml Startpuffer + 0,12 M NaCl
500 ml Startpuffer + 0,25 M NaCl

Flußrate : 22 ml / h

Fraktionen : 5,5 ml / 15 min

100 mg Globin wurden in 25 ml Startpuffer pH 8,5 gelöst, 35 % 1,4 - Dithioerythrit (bezogen auf das Gewicht des Globins) dazugegeben, mit Essigsäure auf pH 5,5 gebracht, auf die Säule mit Hilfe einer LKB Pumpe (Microperpex^R Peristaltic Pump) aufgetragen und 45 min mit Harnstoffpuffer äquilibriert. Dann wurde Gradient A angeschlossen, nach 182 Fraktionen (1000 ml) Gradient B.

Der erste Gradient erlaubte die Elution der α^D - und α^A - Ketten, der zweite die der β - Ketten. Die eluierte Lösung

ist direkt mit einem Durchflußphotometer (ISCO UA - 5) bei 280 nm vermessen worden, zur besseren Sichtbarmachung zusätzlich mit einem Spektralphotometer (Spectronic 210 UV Shimadzu) ebenfalls bei 280 nm. Als Entsalzungssäule diente Sephadex G 25 medium (2,5 x 130 cm), als Puffer 0,1 N Essigsäure. Die Flußrate betrug 150 ml / h. Die zu einem Gipfel gehörenden Fraktionen wurden vereinigt, mittels Rotationsverdampfer eingeeengt und lyophilisiert.

Die genannten Gradienten erwiesen sich für die Ketten-trennung des Schwarzdrossel - und Mauerseglerglobins als die besten.

4. Sequenzbestimmung der α - und β - Ketten

4.1. Oxidation

Um Cysteine und Methionine hydrophiler zu bekommen, wurden in Anlehnung an die Methode von Hirs (1956) die Ketten mit Perameisensäure oxidiert: Ameisensäure + 30 % Perhydrol im Verhältnis 10 : 1 vermischt, 1 h bei Raumtemperatur und im Dunkeln aufbewahrt, 15 min in den Kühlschrank gestellt (+ 5°C), 100 μ l davon zu 10 mg Globinkette pipettiert, 5 min bei einer Temperatur von + 5°C oxidiert, mit 10 ml Aqua bidest. verdünnt und lyophilisiert.

4.2. Enzymatische Spaltung

Die Ketten wurden mit TPCK - Trypsin (Firma Worthington), nach der von Guidotti et al. (1962) beschriebenen Methode durchgeführt. 5 - 10 mg oxidiertes Material wurden in 300 - 400 μ l Aqua bidest. gelöst und mit verdünnter Ammoniaklösung (1 Teil Ammoniak zu 3 Teilen Aqua bidest.) auf einen pH von 10,6 gebracht. 5 % TPCK - Trypsin (bezogen auf das Gewicht der Kette) wurden in 50 μ l Aqua bidest. gelöst, zur vorbereiteten Globinkette dazugegeben und 90 min bei Raumtemperatur gespalten. Mit verdünnter Essigsäure (1 Teil konzentrierte Essigsäure zu 3 Teilen Aqua bidest.) wurde der pH auf 8,4 gebracht, 5 % TPCK - Trypsin dazugegeben und wieder 90 min bei Raumtemperatur gespalten. Die Reaktion konnte durch die Zugabe von konzentrierter Essigsäure, bis zum Erreichen des pH 3,5, gestoppt werden.

Die β - Ketten beider Spezies zeigten bei diesem pH nach Zentrifugation einen weißen, in Wasser unlöslichen Niederschlag (Core - Fraktion), welcher bei - 68°C aufbewahrt wurde.

4.3. Hochdruck - Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Isolierung der tryptischen Peptide wurde die von Kratzin et al. (1980) beschriebene Methode verwendet.

Verwendete Apparatur:

HPLC - Gerät: Beckman Liquid Chromatograph
 Model 334
 Pumpen (112 SDM , Beckman)
 Controller (421 , Beckman)
 Photometer (UV - Detektor BT 3030, Biotronik)
 Schreiber (CR 2 AX , Shimadzu)
 Säulen: 4,6 mm x 250 mm , Edelstahl .

Mit dem Packgerät Shandon (Gynkotheke) konnten die Säulen in unserer Abteilung gefüllt werden.

Säulenfüllmaterialien:

Li Chrosorb RP 2, Partikelgröße 7 μm (Merck)
 Li Chrosorb RP 18, Partikelgröße 5 μm (Merck)
 Vydak RP 18 , Partikelgröße 10 μm (Chrompack)

Organisches Lösungsmittel: Acetonitril

Wässrige Phase:

0,1 % Trifluoressigsäure
 (für Vydak RP 18, LiChrosorb RP 18, LiChrosorb RP 2)
 0,05 M Ammoniumacetat (für LiChrosorb RP 2)

Gradient: 0 - 60 % Acetonitril
 Flußrate: 1 ml / min
 Detektion: 230 nm
 Temperatur: 18 - 20°C (Raumtemperatur)
 Aufgetragene Menge: 100 nmol

Die einzelnen Gipfel wurden manuell in Reagenzgläschen aufgefangen, im Stickstoffstrom getrocknet, in Aqua bidest. aufgenommen und lyophilisiert, anschließend in 0,1 N Essigsäure gelöst.

4.4. Dünnschichtelektrophorese

Zur Überprüfung der Reinheit der peptidhaltigen Gipfel wurde ein Aliquot von 0,5 - 2 nmol Material kleinflächig auf DC - Celluloseplatten aufgetüpfelt und mit einem Fön getrocknet. Pro Platte konnten 7 - 8 Proben getüpfelt werden. Nach Besprühen mit dem Elektrophoresepuffer wurden die Platten schnell in die wassergekühlte horizontale Elektrophoresekammer eingebracht.

Trägermaterial: DC - Celluloseplatten
(0,1 x 10 x 20 cm, Merck, Darmstadt,
ohne Fluoreszenzindikator)

Elektrophoresepuffer: 5 % Pyridin
5 % Aceton

mit konz. Essigsäure ad pH 5,4 in H₂O

Laufzeit: 60 - 90 min

Spannung: 450 Volt (12 - 15 mA)

Die Platten wurden herausgenommen, ca. 10 min bei +80°C getrocknet, mit Ninhydrin besprüht und 10 min bei einer Temperatur von +80°C entwickelt. Alle Peptide werden bläulich - violett angefärbt. Um detailliertere Erkenntnisse der Aminosäurezusammensetzung von Peptiden zu erhalten, wurden spezifische Farbttests durchgeführt: Tyr - His (Pauly 1915, Frank & Petersen 1955), Arg (Gottlieb & Itano 1963), Trp (Dagliesh 1952), Cys und Met (Winnegard et al. 1948).

4.5. Analysen

Die Methode von Spackman et al. (1958) kam für die Ermittlung der Bruttoformeln der Globinketten wie auch der einzelnen Peptide zur Anwendung. 3 nmol je Peptid wurden in 5,7 N Salzsäure gelöst und unter Vakuum bei einer Temperatur von + 110°C 20 h beziehungsweise 200 h hydrolysiert. Globinketten wurden nach der Methode von Matsubara et al. (1969) mit 6 % Thioglycolsäure behandelt (die Tryptophane werden nicht zerstört), cystein- und methioninhaltige Peptide in Anlehnung an das Verfahren von Hirs (1956) mit Perameisensäure oxidiert. Durch die saure Hydrolyse werden die Peptidbindungen zerstört, die Aminosäuren liegen einzeln in der Lösung vor. Die Salzsäure wurde mit einer Vakuumzentrifuge entfernt und das getrocknete Material in 100 µl Citratpuffer pH 2,2 gelöst. Die Aminosäuren konnten mit Hilfe eines automatischen Analysators der Firma Biotronik LC 5000 säulenchromatographisch getrennt werden. Zur Verwendung kamen 5 Puffer von pH 3,54 bis pH 10,5 und Temperaturen von + 48 bis + 70°C. Eluiert wurden zuerst die sauren, anschließend die neutralen und basischen Aminosäuren. Zur Detektion wurde Ninhydrin verwendet.

4.6. Aminosäuresequenzen

Die Reihenfolge der Aminosäuren in den Peptiden wurde mit Hilfe automatischer Flüssigphasen - Sequenatoren (Beckman 890 B, 890 C und 890 C 2) mit der Filmtechnik nach Edman und Begg (1967), oder mit einem Gasphasen - Sequenator von Begg et al. (1986) nach der Methode von Hunkapillar et al. (1983) ermittelt.

Die Flüssigphasen - Sequenatoren wurden zum Sequenzieren von Globinketten (42 Abbauschritte, 125 nmol), und von längeren Peptiden (mehr als 15 Aminosäurereste, 10 - 60 nmol) verwendet. Zwei Abbauprogramme kamen zur Anwendung:

a. Das Quadrolprogramm für Lysinpeptide - nach Braunitzer et al. (1971).

0,25 M Quadrol als Kupplungspuffer und Reagenz IV = 7 (Isothiocyanato) naphthalin - 1,3,5 - trisulfonsäure, Na - Salz, zur Umsetzung der Peptide.

Die Konversion erfolgt automatisch im Autokonverter (Sequemat P - 6, Fa. Kontron Technik GmbH) mit 1,9 M TFA bei + 60°C

b. Das Propinprogramm - nach Braunitzer et al. (1970).

Kupplungspuffer ist 1,25 M Diethylaminopropin, pH 9,0, für Argininpeptide, lange hydrophobe Peptide mit Reagenz I = 4 (Isothiocyanato) benzolsulfonsäure, Na - Salz (Pfletschinger et al. 1980) umgesetzt und hydrophile Peptide bis 4 Aminosäuren.

Die Konversion erfolgt manuell mit 1,9 M TFA 14 min bei + 80°C.

Die Gasphasen - Sequenatoren sind zur Sequenzermittlung von Peptiden (Mengen von 1 - 3 nmol) verwendet worden.

Die PTH - Aminosäuren wurden durch HPLC mit Hilfe zweier Elutionssysteme analysiert:

a. Stufengradientelution - nach Zimmermann et al. (1977).

Gerät: HPLC 1084 B Liquid Chromatograph,
Fa. Hewlet Packard.

Säule: ODS - Hypersil RP 18, Shandon
(4,6 x 250 mm).

Flußrate: 1,2 ml / min

Puffer A: 10 mM Ammoniumacetat pH 4,8

Puffer B: Acetonitril.

Stufengradient: Start mit 10 % B
nach 1 min. 20 % B
nach 5 min. 45 % B
nach 14 min. 70 % B
nach 19 min. 10 % B

Temperatur: + 60°C

Detektion: bei 265 nm mit multichromatischem Licht gegen 330 nm. Serin und Threonin geben negative Gipfel.

Aufgetragene PTH - Aminosäuremenge: 1 - 3 nmol.

b. Isokratische Elution - nach Lottspeich (1980)

Säule: ODS - Hypersil RP 18, Shandon
(4,6 x 250 mm).

Flußrate: 1,7 ml / min.

Puffer: 685 ml 0,02 M Natriumacetat pH 5,2
315 ml Acetonitril
Wasser ad 1000 ml.

Temperatur: + 60°C

Detektion: bei 265 nm, Serin und Threonin bei 330 nm.

III. ERGEBNISSE

1. Das Hämoglobin der Schwarzdrossel

1.1. Globingewinnung

Die Gewinnung des Blutes, der Erythrozytensuspension, die Hämolysen und Hämabspaltung erfolgten wie in II. 1.1. - 1.4. beschrieben.

1.2. Komponententrennung

a.

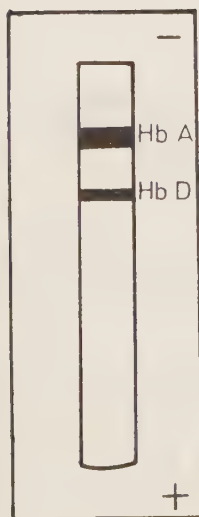


Bild 1.

Polyacrylamid - Gelelektrophorese
unter nativen Bedingungen (II. 2. 1.)
2 Bänder mit unterschiedlicher
Konzentration
Hb D = feiner, schneller wandernd
Hb A = breiter, langsamer wandernd
Aufgetragene Menge: 75 µg

b. Die Methode mittels FPLC, beschrieben in II. 2.2. zeigt zwei Komponenten:

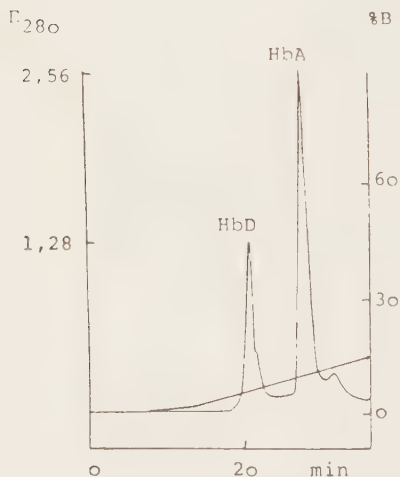


Diagramm 1.

Komponententrennung des
Hämolysates der Schwarzdrossel

Methode: FPLC

Säule: TSK SP - 5 PW
(8 x 75 mm)

Puffer: A.

0,01 M NaH_2PO_4 pH 4,91
0,01 M Na_2HPO_4 pH 9,64
durch Mischung auf pH 6,95

B.

Puffer A + 1 M NaCl pH 6,95

Durchfluß: 0,5 ml / min

Gradient: 8 min isokratisch
in 5 min auf 5 % B
in 27 min auf 16 % B

Probe: 0,8 mg Hb

Detektion: U.V., 280 nm

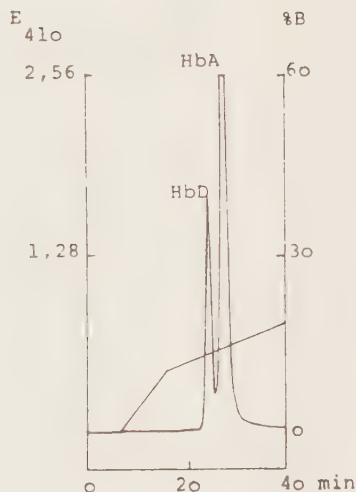


Diagramm 2.

Komponententrennung des
Hämolysates der Schwarzdrossel

Methode: FPLC

Säule: TSK SP - 5 PW
(8 x 75 mm)

Puffer: A.

0,01 M NaH_2PO_4 pH 4,91
0,01 M Na_2HPO_4 pH 9,64
durch Mischung auf pH 6,75

B.

Puffer A + 1 M NaCl pH 6,75

Durchfluß: 0,5 ml / min

Gradient: 5 min isokratisch
in 5 min auf 10 % B
in 30 min auf 25 % B

Probe: 1 mg Hb

Detektion: 410 nm

1.3. Kettentrennung

a. Die Tritongelelektrophorese (s.II.3.1.) zeigte 3 Banden, von welchen die am schnellsten wandernde α^A , die mittlere α^D und die am langsamsten wandernde β - Kette war.

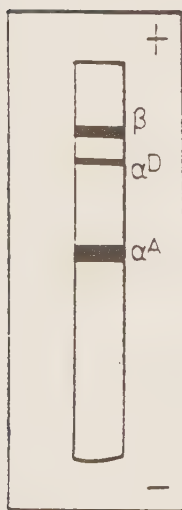


Bild 2

Polyacrylamid - Gelelektrophorese
unter dissoziierenden Bedingungen
Probe: 70 μ g

b. Präparativ wurden die Globinketten mittels CM - Cellulose und 2 linearen Kochsalzgradienten getrennt. (s.II.3.2)

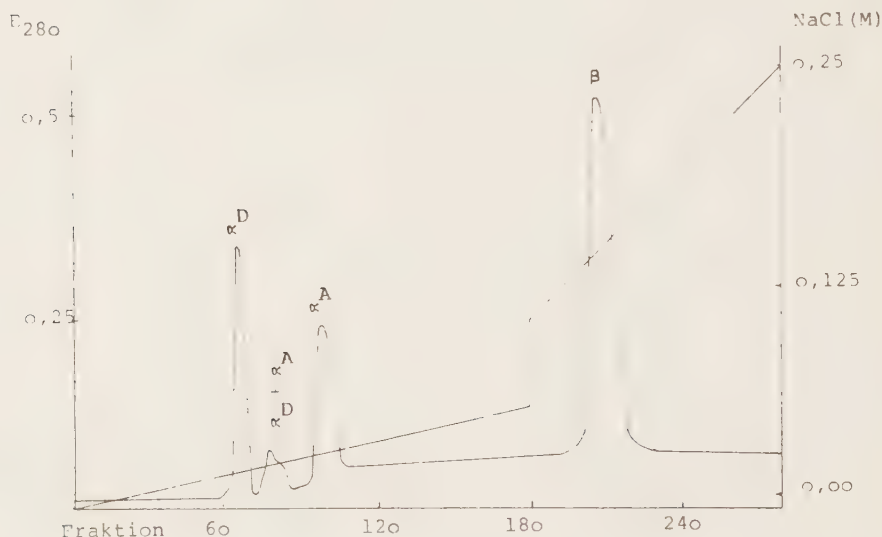


Diagramm 3.

Kettentrennung des Schwarzdrosselglobins über CM - Cellulose

Säule:	CM - Cellulose 52 (Whatman) (Ø 2,5 x 14 cm)
Puffer:	8 M Harnstoff 0,01 % 1,4 - Dithioerythrit 0,02 M Natriumacetat pH 5,5
Durchfluß:	22 ml / h (5,5 ml / Fraktion)
Gradient: A.	500 ml Startpuffer + 0,02 M NaCl
(linear)	500 ml Startpuffer + 0,10 M NaCl
B.	500 ml Startpuffer + 0,12 M NaCl
	500 ml Startpuffer + 0,25 M NaCl
Probe:	100 mg Globin in 25 ml Startpuffer

Mit dem ersten, flacheren Gradienten konnten die α^A und α^D - Ketten eluiert werden. Der zweite Gradient wurde steiler angelegt. Nur so konnte ein scharfer Gipfel erzielt werden (s. Diagramm 3), welcher die β - Ketten enthielt.

Die einzelnen Gipfel wurden mittels Tritongeleelektrophorese auf Reinheit überprüft.

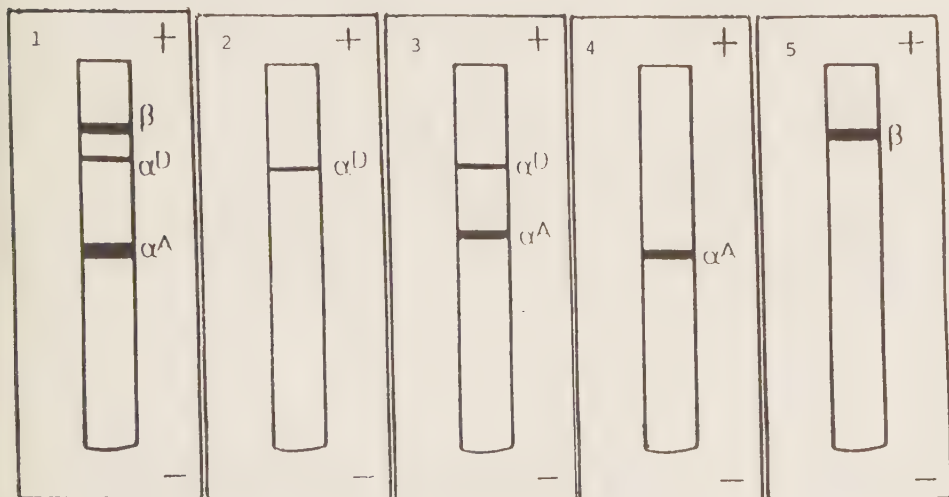


Bild 3

Polyacrylamid - Gelelektrophoresen der Gipfelfractionen der Kettentrennung (s. Diagramm 3)

- 1 - Gesamthämoglobin
- 2 - Erster Gipfel: α^D - Kette
- 3 - Zweiter Gipfel: $\alpha^D + \alpha^A$ - Ketten
- 4 - Dritter Gipfel: α^A - Kette
- 5 - Vierter Gipfel: β - Kette

Prozentualer Anteil:

12.99 % α^D Kette
 53.10 % α^A Kette
 34.05 % β Kette

1.4. Tryptische Peptide der α^A - Ketten

10 mg oxidierte α^A - Kette (s.II.4.2.) wurde mit 10 % TPCK - Trypsin (bezogen auf das Gewicht der Kette) 3 h gespalten (90 min bei pH 10,8 und 90 min bei pH 8,6). Durch Senkung des pH Wertes auf pH 3,3 wurde die Spaltung gestoppt. Die α^A - Kette der Schwarzdrossel zeigte nach Zentrifugation kein Core.

Mittels HPLC (s.II.4.3.) konnten die tryptischen Peptide auf einer RP - 2 Säule getrennt werden (s.Diagramm 4).

Alle Gipfel, in denen mehrere Peptide vorhanden waren, wurden mit einer Vydak RP - 18 Säule rechromatographiert (s. Diagramm 5).

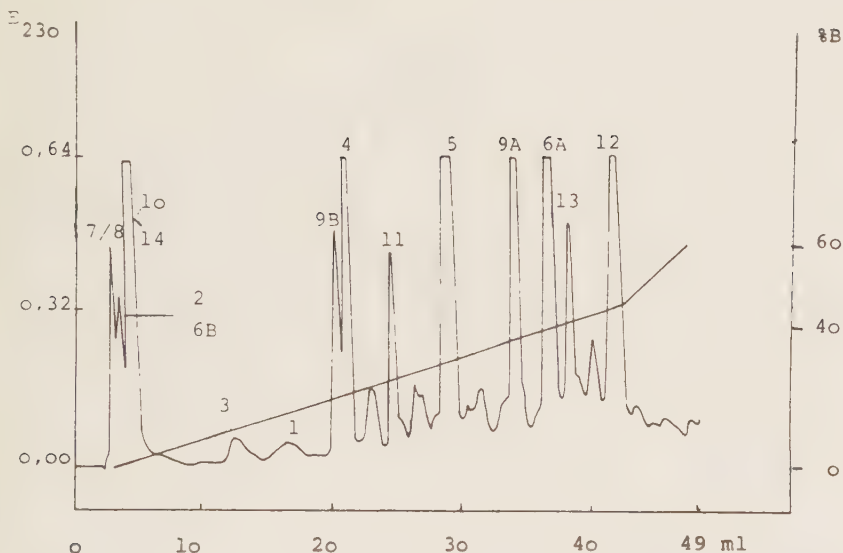


Diagramm 4.

Isolierung der tryptischen Peptide der α^A - Ketten des
Schwarzdrosselglobins mit dem HPLC - System.

Säule:	RP - 2, 7 μ m LiChrosorb ($\varnothing$ 4,6 x 250 mm)
Wässrige Phase:	0,05 M Ammoniumacetat
Organisches Lösungsmittel:	Acetonitril
Durchfluß:	1 ml / min
Gradient:	3 min isokratisch
	in 40 min auf 40 % B
	in 5 min auf 60 % B

In diesem und den folgenden Diagrammen entsprechen die
Nummern der Gipfel dem jeweiligen tryptischen Peptid.

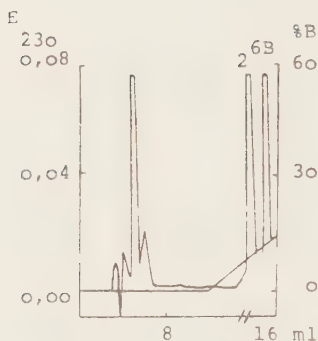


Diagramm 5

Trennung der tryptischen
Peptide Tp 2 + Tp 6B der α^A
Globinkette mit dem HPLC - System.

Säule: RP - 18, 10 μ m Vydak
($\varnothing$ 4,6 x 250 mm)
Wässrige Phase: 0,1 % Trifluoressigsäure
Organisches
Lösungsmittel: Acetonitril + 0,1 % TFA
Durchfluß: 1 ml / min
Gradient: 10 min isokratisch
in 20 min auf 40 % B
in 10 min auf 60 % B

1.5. Tryptische Peptide der α^D - Ketten

6 mg α^D - Kette wurde 90 min. bei pH 11 durch Zugabe von 5 % TPCK - Trypsin gespalten, der pH auf 8,7 gesenkt, 5 % TPCK - Trypsin dazugegeben und wieder 90 min bei Raumtemperatur gespalten. Durch Senkung des pH auf 3,2 wurde die enzymatische Aktivität des Trypsins gestoppt.

Die α^D - Ketten des Globins der Schwarzdrossel ergaben kein Core.

Die Peptide der α^D - Ketten konnten durch Trennung auf einer RP - 2 Säule nicht sauber erhalten werden, weshalb mehrere Rechromatographien mit einer Vydak RP - 18 Säule durchgeführt werden mußten. (s. Diagramme 7, 8, 9, 10)

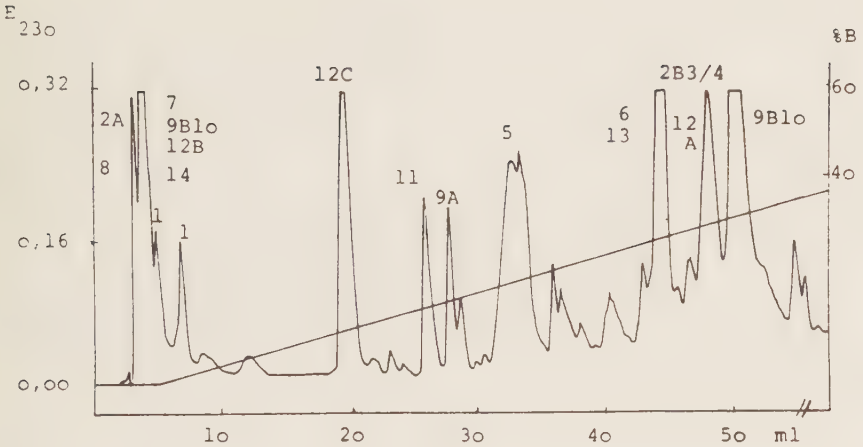


Diagramm 6

 Isolierung der tryptischen Peptide der α^D - Ketten des
 Schwarzdrosselglobins mit dem HPLC - System

Säule: RP - 2, 7 μ m LiChrosorb
 ($\emptyset$ 4,6 x 250 mm)
 Wässrige Phase: 0,05 M Ammoniumacetat
 Organisches Lösungsmittel: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml / min
 Gradient: 5 min isokratisch
 in 60 min auf 40 % B
 in 5 min auf 60 % B

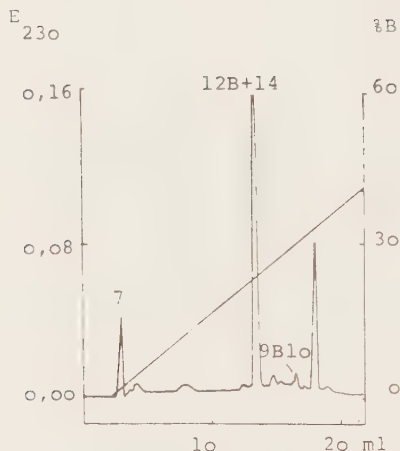


Diagramm 7

Trennung der tryptischen Peptide
Tp 7, Tp 12 B, Tp 14, Tp 9 B 10
mit dem HPLC - System

Säule: RP - 18, 10 μ m Vydak
($\emptyset$ 4,6 x 250 mm)

Wässrige Phase: 0,1 % TFA

Organisches

Lösungsmittel: Acetonitril + 0,1 % TFA

Durchfluß: 1 ml / min

Gradient: 2 min isokratisch
in 20 min auf 40 % B
in 10 min auf 60 % B

Tp 12 B + 14 konnten nur mit einem flacheren Gradienten getrennt werden (s. Diagramm 8)

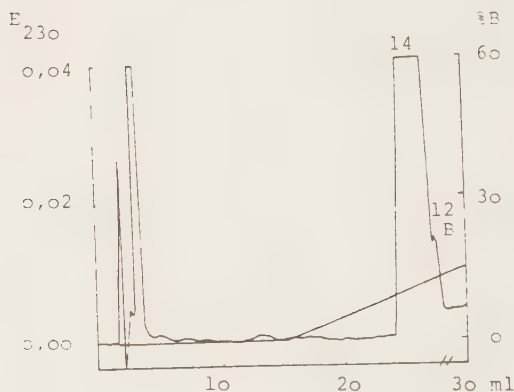


Diagramm 8

Trennung der tryptischen Peptide
Tp 12 + 14 mit dem HPLC - System
wie in Diagramm 7 beschrieben, mit
einem anderen Gradienten und
größerer Empfindlichkeit:

Gradient: 15 min isokratisch
in 30 min auf 30 % B
in 10 min auf 60 % B

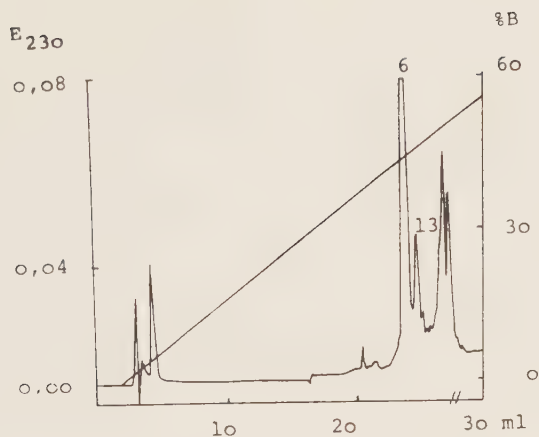


Diagramm 9

Trennung der tryptischen Peptide Tp 6 + Tp 13 Bedingungen s. Diagramm 7.

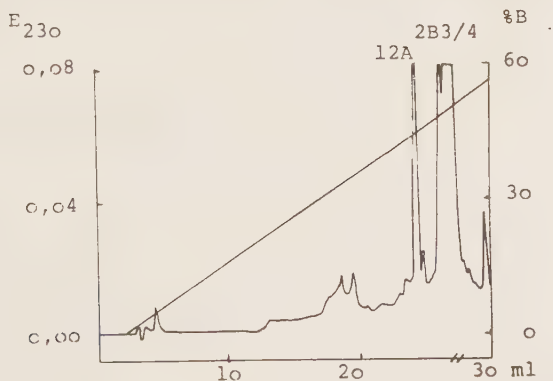


Diagramm 10

Trennung der tryptischen Peptide Tp 12 + Tp 2B3/4 Bedingungen s. Diagramm 7.

1.6. Tryptische Peptide der β - Ketten.

15 mg β - Kette wurde 100 min bei pH 10,9 durch Zugabe von 5 % Trypsin gespalten, der pH auf 8,6 gesenkt, mit 5 % Trypsin vermischt und 90 min gespalten.

Die tryptische Spaltung wurde durch titrieren auf pH 3,2 beendet.

Die β - Kette des Schwarzdrosselglobins hatte ein Core.

Die hydrophilen Peptide konnten mit einer RP - 2 Säule rein isoliert werden (s.Diagramm 11).

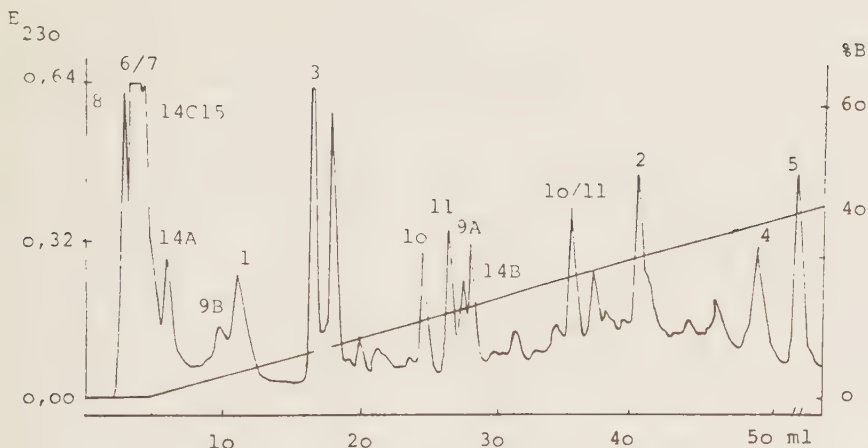


Diagramm 11

Isolierung der tryptischen Peptide der β - Ketten des Schwarzdrosselglobins mit dem HPLC - System.

Säule:	RP - 2, 7 μ m LiChrosorb ($\varnothing$ 4,6 x 250 mm)
Wässrige Phase:	0,05 M Ammoniumacetat
Organisches Lösungsmittel:	Acetonitril
Durchfluß:	1 ml / min
Gradient:	5 min isokratisch in 60 min auf 40 % B in 5 min auf 60 % B

Bei pH 3,2 befanden sich 50 % von Tp 5 und 100 % Tp 12 + 13 im Core, welches in 0,1 % - iger TFA löslich war.

Tp 12 + 13 konnten, obwohl als Spaltstelle in Position 120 ein Lysin vorhanden ist, auch durch verschiedene Änderungen wie längere Spaltzeit, längere Oxidationszeit, mehr Trypsin (8 %), nicht getrennt werden. Mit Hilfe des Propinprogrammes konnten die Aminosäuren problemlos schrittweise abgebaut und anschließend identifiziert werden.

Die Reinigung der Corepeptide erfolgte über das HPLC - System mit Hilfe einer RP - 2 Säule und 0,1 % - iger TFA als organisches Lösungsmittel (s. Diagramm 12)

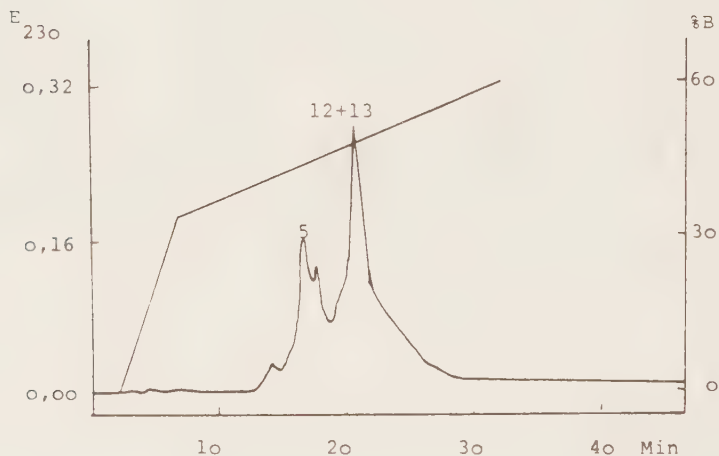


Diagramm 12.

Trennung der tryptischen Core-Peptide Tp 5 + Tp 12 + 13 der β - Kette des Schwarzdrosselglobins mit dem HPLC - System.

Säule: RP - 2, 7 μ m LiChrosorb
($\varnothing$ 4,6 x 250 mm)
Wässrige Phase: 0,1 % TFA
Organisches Lösungsmittel: Acetonitril + 0,1 % TFA
Durchfluß: 1ml / min
Gradient : 2 min isokratisch
in 5 min auf 35 % B
in 25 min auf 60 % B

Tabelle 1

Analysen der tryptischen Peptide der α^A - Kette des Schwarzdrosselglobins

Pos.	Tp 1 1-7	Tp 2 8-11	Tp 3 12-16	Tp 4 17-31	Tp 5 32-40	Tp 6A 41-50	Tp 6B 51-56	Tp 7 57-60	Tp 8 61	Tp 9A 62-82	Tp 9B 83-90	Tp 10 91-92	Tp 11 93-99	Tp 12 100- 127	Tp 13 128- 139	Tp 14 140- 141	(S)	K
Asx	1.37 (1)	1.04	-	1.07	-	1.07	-	-	-	3.06	1.07	-	2.02	2.04	-	-	(12)	12.30
Thr	-	1.05	-	1.00	1.89	0.98	-	-	-	-	-	-	-	2.74	1.77	-	(10)	9.75
Ser	0.68 (1)	-	1.84	-	-	-	0.89	-	-	0.99	0.91	-	-	1.68 (2)	-	-	(8)	7.36
Glx	-	-	-	4.07	1.25	-	1.12	-	-	1.18	1.16	-	-	1.66 (2)	-	-	(10)	11.16
Pro	-	-	-	-	0.77	0.84	-	-	-	-	-	-	1.06	1.70	-	-	(5)	4.71
Gly	-	-	-	2.80	-	1.18	1.03	0.71	-	1.11	-	-	-	1.00	1.21	-	(9)	9.18
Ala	1.76	-	1.04	2.08	1.31 (1)	-	1.05	0.84	-	7.47 (8)	0.99	-	-	2.20	2.04	-	(21)	20.14
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.11	1.06	-	(2)	2.40
Val	0.92	0.94	-	-	-	-	0.94	-	-	2.90	-	-	1.84	3.15	1.80	-	(13)	12.48
Met	-	-	-	-	0.85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(1)	0.85
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)	
Ile	-	-	-	0.95	-	-	-	-	-	0.95	-	-	-	-	-	-	(2)	1.85
Leu	1.17	-	-	1.03	-	1.14	-	-	-	2.07	1.92	0.95	-	6.44 (6)	2.18	-	(16)	16.37
Tyr	-	-	-	0.94	0.79	0.78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.93	(4)	3.86
Phe	-	-	1.25	-	1.00	1.80	-	-	-	-	-	-	1.04	1.33 (1)	0.91	-	(7)	7.00
Lys	1.06	0.95	0.86	-	1.09	1.07	0.94	1.12	1.12	1.20	0.96	-	1.07	0.93	1.00	-	(13)	12.40
His	-	-	-	-	-	1.10	-	1.19	-	-	0.94	-	-	1.95	-	-	(5)	6.16
Arg	-	-	-	1.02	-	-	-	-	-	-	-	1.05	-	-	-	1.05	(3)	3.08
Summe	7	4	5	15	9	10	6	4	1	21	8	2	7	28	12	2	141	

(S) = Summe der Aminosäuren

K = Kettenanalyse

Die in Klammern befindlichen Zahlen zeigen die Anzahl der Aminosäuren nach der Sequenzanalyse

Tabelle 2

Analysen der tryptischen Peptide der α^D -Kette des Schwarzdrosselglobins

Pos.	Tp 1 1-7	Tp 2A 8	Tp 2B/3/4 9-31	Tp 5 32-40	Tp 6 40-56	Tp 7 56-60	Tp 8 61	Tp 9A 62-71	Tp 9B10 72-89 90-92	Tp 11 93-99	Tp 12A 100- 112	Tp 12B 113- 115	Tp 12C 116- 127	Tp 13 128- 139	Tp 14 140- 141	(S)	K
Asx	0.98	-	1.46 (1)	-	1.02	-	-	0.95	3.95 0.95*	1.99	-	-	0.91	-	-	(12)	12.12
Thr	0.89	-	-	0.94	1.89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(4)	4.39
Ser	-	-	1.01	0.99	0.97	-	-	-	2.69 (3)	-	0.82	-	1.63 (2)	-	-	(9)	8.20
Glx	1.08	-	4.13	1.22	3.22	-	-	-	2.23	-	2.16	-	2.24	1.30	-	(16)	15.55
Pro	-	-	-	1.90	1.01	-	-	-	-	1.09	-	-	0.98	-	-	(5)	5.55
Gly	1.02	-	2.66 (3)	-	1.04	1.82	-	1.19	-	-	-	1.00	-	-	-	(9)	9.96
Ala	-	-	2.13	-	-	-	-	2.91	2.03	-	2.83	-	1.12	4.62 (5)	-	(16)	16.23
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.95	-	-	-	-	(1)	0.86
Val	0.79	-	1.81	-	1.02	-	-	1.01	1.17	1.97	0.93	-	1.97	1.90	-	(13)	12.26
Met	-	-	-	0.99	-	-	-	0.80	-	-	-	-	-	0.81	-	(3)	2.54
Trp	-	-	(1)*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(1)	0.92
Ile	-	-	0.78	-	0.90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(2)	1.49
Leu	0.93	-	4.02	-	-	-	-	1.10	4.07 1.07*	-	3.11	0.98	-	1.18	-	(16)	15.80
Tyr	-	-	0.81	0.82	0.87	-	-	-	0.67	-	-	-	0.84	-	0.75	(6)	5.63
Phe	-	-	-	1.01	2.03	-	-	0.92	-	0.94	1.24	-	-	1.19	-	(7)	6.66
Lys	1.28	1.00	-	1.09	-	1.13	1.00	1.07	-	0.98	-	1.01	1.07	0.97	-	(10)	10.56
His	-	-	2.15	-	1.22	1.04	-	-	1.17	-	-	-	0.86	-	-	(6)	7.51
Arg	-	-	0.99	-	0.75	-	-	-	0.96*	-	0.92	-	-	-	1.24	(5)	4.51
Summe	7	1	23	9	16	4	1	10	21	7	13	3	12	12	2	141	

* - Aminosäuren des chymotryptisch gespaltenen Peptides Tp 9B10,

(S) = Summe der Aminosäuren

K = Kettenanalyse

() * = zerstörtes Trp

Die in Klammern befindlichen Zahlen zeigen die Anzahl der Aminosäuren nach der Sequenzanalyse

Tabelle 3

Analysen der tryptischen Peptide der β - Kette des Schwarzdrosselglobins

Pos.	Tp 1 1-8	Tp 2 9-17	Tp 3 18-30	Tp 4 31-40	Tp 5 41-59	Tp 6/7 60-65	Tp 8 66	Tp 9A 67-76	Tp 9B 77-82	Tp 10 83-95	Tp 11 96- 104	Tp 12+13 105- 132	Tp 14A 133- 135	Tp 14B 136- 143	Tp 14C/15 144- 146	(S)	K
Asx	-	-	1.12	-	1.96	-	-	-	2.00	1.11	2.00	3.03	-	-	-	(11)	11.49
Thr	0.98	1.02	-	1.11	1.10	-	-	0.96	-	0.90	-	1.24	-	-	-	(7)	6.94
Ser	-	-	-	-	2.56 (3)	-	-	0.89	0.91	0.97	-	-	-	-	-	(6)	5.90
Glx	3.07	1.28	2.27	1.17	-	0.62 (1)	-	1.26	-	2.25	1.16	2.37 (2)	-	-	-	(14)	13.11
Pro	-	-	-	1.38 (1)	2.07	-	-	-	-	-	0.86	1.19	-	-	-	(5)	5.28
Gly	-	1.87	1.77	-	2.05	0.99	-	0.99	-	1.03	-	2.20	-	-	-	(11)	10.74
Ala	1.03	-	2.74	-	2.06	1.19	-	1.11	-	1.10	-	3.76	-	3.17	-	(16)	16.66
Cys	-	-	1.10	-	-	-	-	-	-	0.90	-	0.93	-	-	-	(3)	2.56
Val	0.92	-	1.79	0.76	1.13	0.88	-	1.80	-	-	0.96	2.50 [^] (3)	1.17	1.33 [^] (2)	-	(15)	14.62
Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)	
Trp	0.97	(1) [*]	-	(1) [*]	-	-	-	-	-	-	-	(1) [*]	-	-	-	(4)	2.33
Ile	-	0.73	-	0.66 (1)	-	-	-	-	0.93	-	-	0.97	-	-	-	(4)	3.81
Leu	-	2.08	1.05	2.21	2.24	-	-	1.09	1.06	1.94	1.21	4.35 (4)	0.87	1.32 (1)	-	(18)	18.04
Tyr	-	-	-	0.54 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.86	(2)	2.37
Phe	-	-	-	-	2.58 (3)	-	-	0.92	-	0.87	0.94	2.00	-	-	-	(8)	7.64
Lys	1.00	0.98	-	-	0.96	0.95	1.00	0.96	1.08	0.99	-	1.95	-	-	0.93	(11)	11.02
His	-	-	-	-	-	1.35 (1)	-	-	-	0.89	0.93	1.47 (1)	-	1.08	0.86	(6)	6.68
Arg	-	-	0.90	1.14	-	-	-	-	-	-	0.92	-	0.95	1.08	-	(5)	4.91
Summe	8	9	13	10	19	6	1	10	6	13	9	28	3	8	3	146	

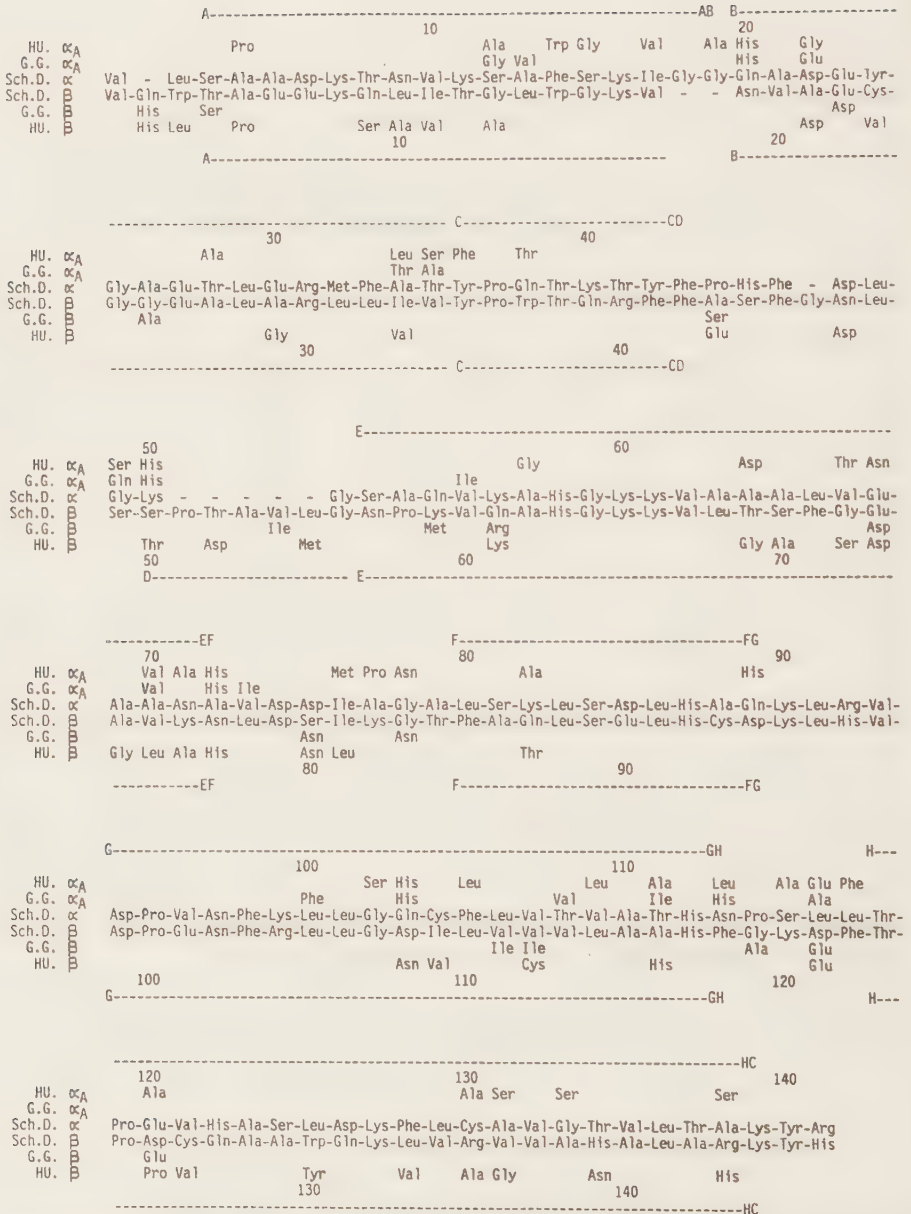
(S) = Summe der Aminosäuren

K = Kettenanalyse

Die in Klammern befindlichen Zahlen zeigen die Anzahl der Aminosäuren nach der Sequenzanalyse

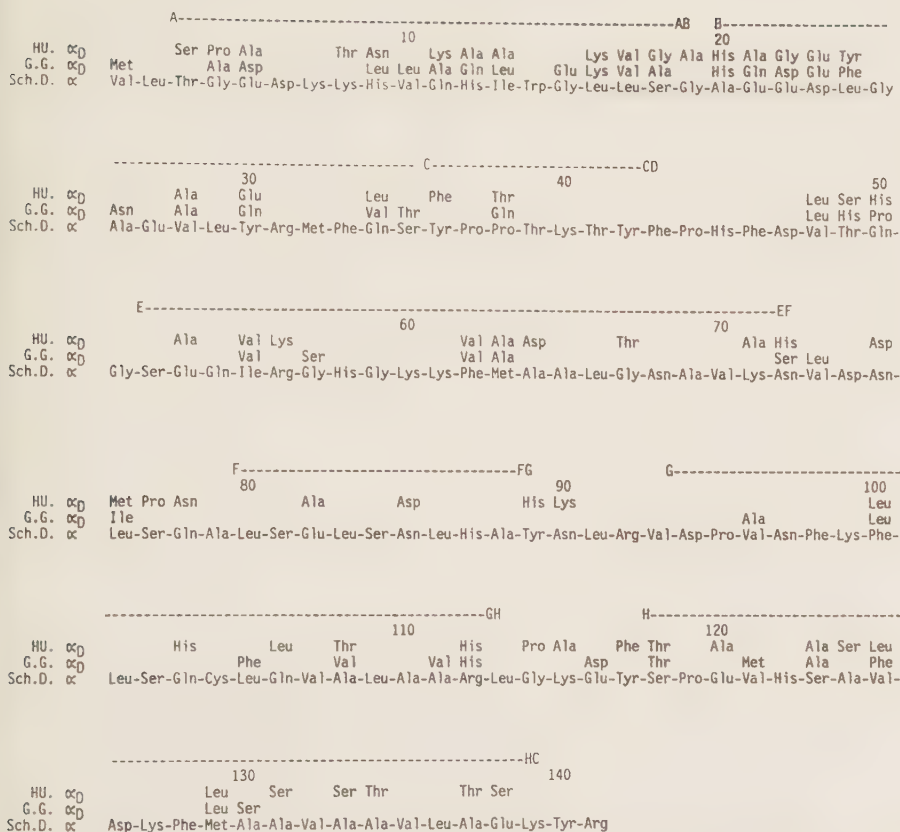
()^{*} - zerstörtes Trp[^] = Val-Val Bindung, die in der 20 h Analyse nicht aufgeht

Abbildung 1



Aminosäuresequenz der α - und β -Ketten der Hämoglobinkomponente Hb A der Schwarzdrossel (*Merula merula*) im homologen Vergleich mit den α - und β -Globinketten des Menschen und den α^A - und β -Globinketten der Graugans

A----AB etc. kennzeichnen helikale Bereiche



Aminosäuresequenz der α^D - Ketten der Hämoglobinnebenkomponente HbD der Schwarzdrossel (Merula merula) im homologen Vergleich mit den α - Globinketten des Menschen und den α^D - Globinketten der Graugans

A-----AB etc. kennzeichnen helikale Bereiche.

2. Das Hämoglobin des Mauerseglers

2.1. Das Blut wurde adulten Vögeln entnommen und als Sammelprobe wie in II.1.1. - 1.4. beschrieben, behandelt.

2.2. Komponententrennung

Das Hämoglobin des Mauerseglers zeigt in der alkalischen Diskelektrophorese zwei unterschiedlich dicke Banden: Hb A als Hauptkomponente, Hb D als Nebenkompente

a.



Bild 4.

Polyacrylamid - Gelelektrophorese
unter nativen Bedingungen (s. II. 2. 1.)
2 Banden mit unterschiedlicher
Konzentration
Hb D = feiner, schneller wandernd
Hb A = breiter, langsamer wandernd
Aufgetragene Menge: 50 µg

b. Die Methode mittels FPLC, beschrieben in II. 2.2. zeigt 3 Komponenten:

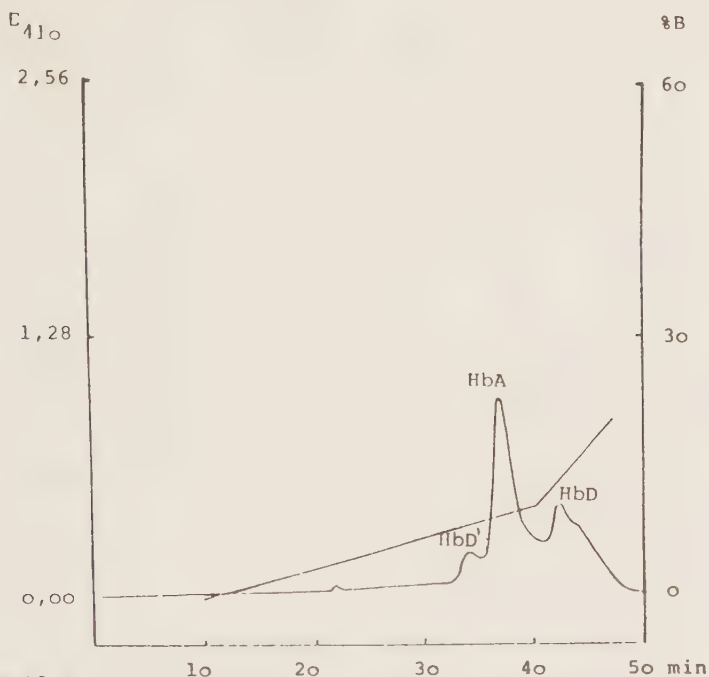


Diagramm 13 a

Komponententrennung des Hämolyrates des Mauerseglers

Methode: FPLC
 Säule: TSK SP - 5 PW
 (8 x 75 mm)
 Puffer: A.
 0,01 M NaH_2PO_4 pH 4,91
 0,01 M Na_2HPO_4 pH 9,64
 durch Mischung auf pH 6,75

B.

Durchfluß: Puffer A + 1 M NaCl pH 6,75
 0,5 ml / min
 Gradient: 10 min isokratisch
 in 40 min auf 10 % B
 in 5 min auf 20 % B
 Probe: 0,3 mg Hb
 Detektion: 410 nm

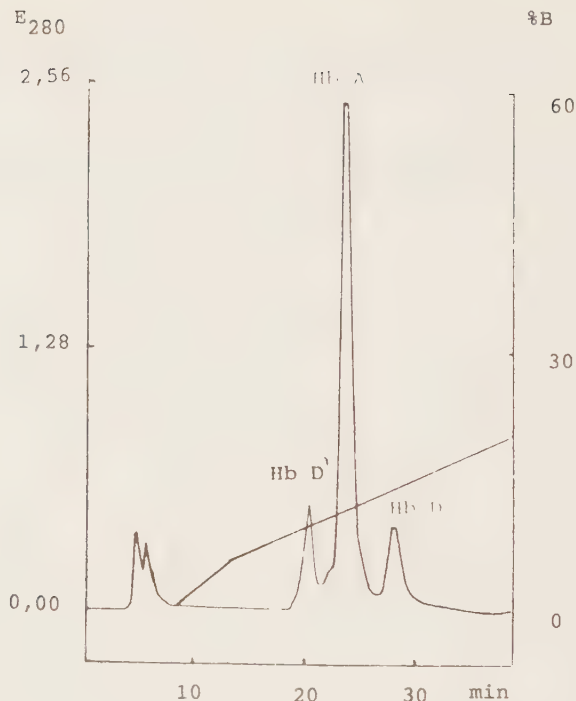


Diagramm 13 b

Komponententrennung des Hämolyrates des Mauerseglers

Bedingungen s. Diagramm 13 a, mit anderem Gradienten,
anderem pH und einer anderen Wellenlänge.

Verwendeter pH: 7,0

Gradient: 8 min isokratisch
in 5 min auf 6 % B
in 40 min auf 20 % B

Probe: 1 mg Hb

Detektion: U.V., 280 nm

Die Hb D' - Komponente ist instabil, sie kann nur in
frischem Material nachgewiesen werden.

3.2. Kettentrennung

a. In der denaturierenden Gelelektrophorese (s.II.3.1.) waren 4 Banden sichtbar, $\alpha^{D'}$ konnte nach längerer Lagerungszeit nicht mehr nachgewiesen werden.

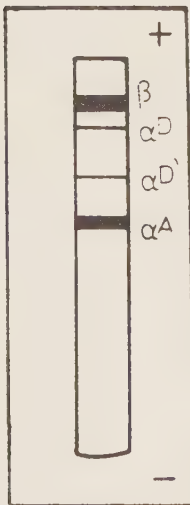


Bild 5

Polyacrylamid - Gelelektrophorese
unter dissoziierenden Bedingungen
Probe: 65 μ g

b. Präparativ wurden die Globinketten des Mauerseglers über CM - Cellulose (s.II.3.2.) getrennt. Der Harnstoffpuffer wurde auf einen pH von 5,56 gebracht.

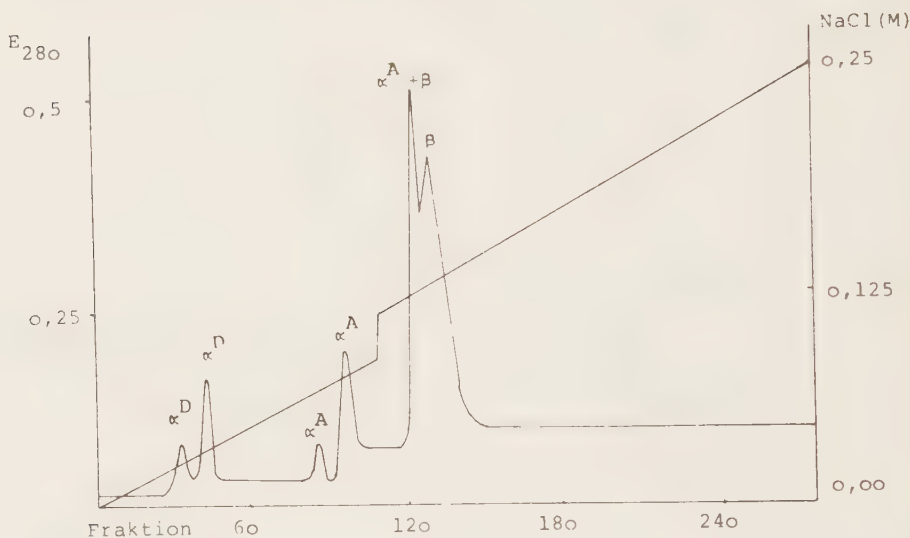


Diagramm 14

Kettentrennung des Mauerseglerglobins über CM - Cellulose:

Säule: CM - Cellulose 52 (Whatman)
(Ø 2,5 x 16 cm)

Puffer: 8 M Harnstoff
0,01 % 1,4 - Dithioerythrit
0,02 M Natriumacetat pH 5,56
22 ml / h (5,5 ml / Fraktion)

Durchfluß:
Gradient: A.
linear

500 ml Startpuffer + 0,02 M NaCl
500 ml Startpuffer + 0,10 M NaCl

B.

linear 500 ml Startpuffer + 0,12 M NaCl
500 ml Startpuffer + 0,25 M NaCl

Probe: 200 mg Globin in 40 ml Originalstartpuffer gelöst.

Die Trennung ergab 6 Gipfel, welche in der Tritongeleelektrophorese auf Reinheit überprüft wurden.

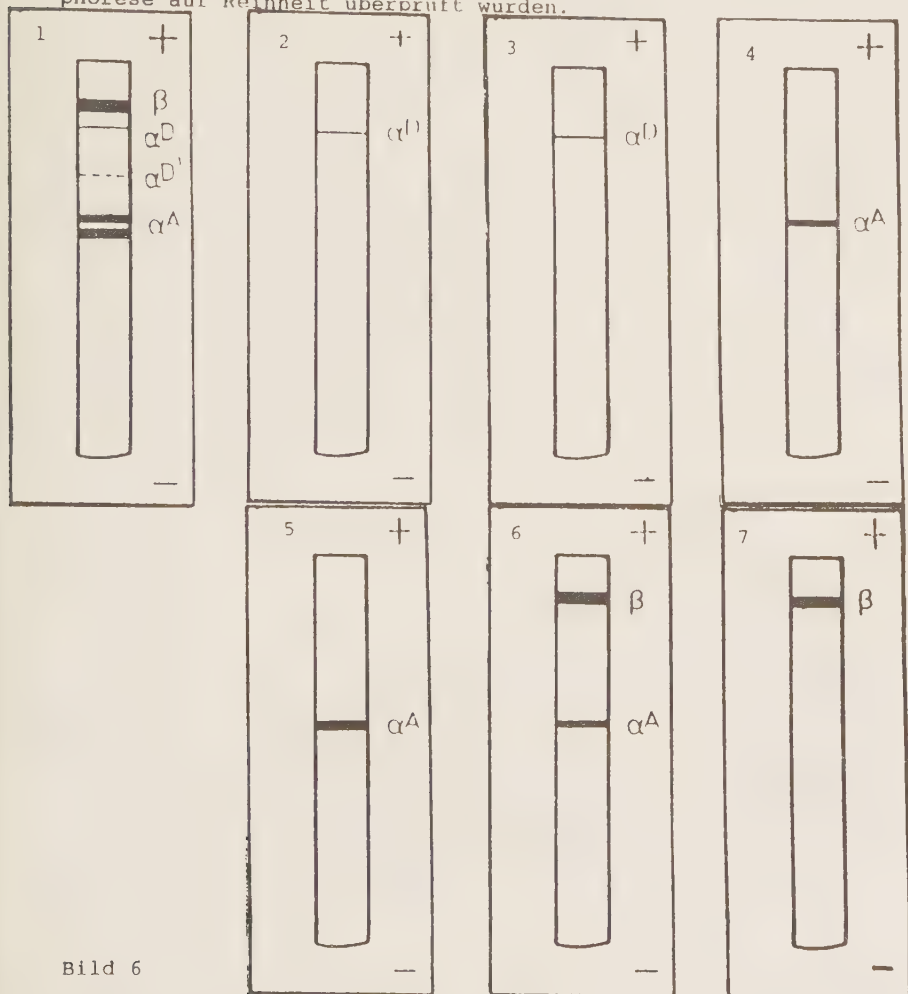


Bild 6

Polyacrylamid - Gelelektrophoresen der Gipfelfractionen der Kettentrennung (s. Diagramm 14)

1 - Gesamtglobin;

2 - Gipfel 1;

3 - Gipfel 2;

4 - Gipfel 3;

5 - Gipfel 4;

6 - Gipfel 5;

7 - Gipfel 6;

Gipfel 3 und 4 zeigten eine gering unterschiedliche Mobilität, die Analysen der tryptischen Peptide beider Gipfel waren identisch.

3.3. Tryptische Peptide der α^A - Ketten (s.III.1.4.)

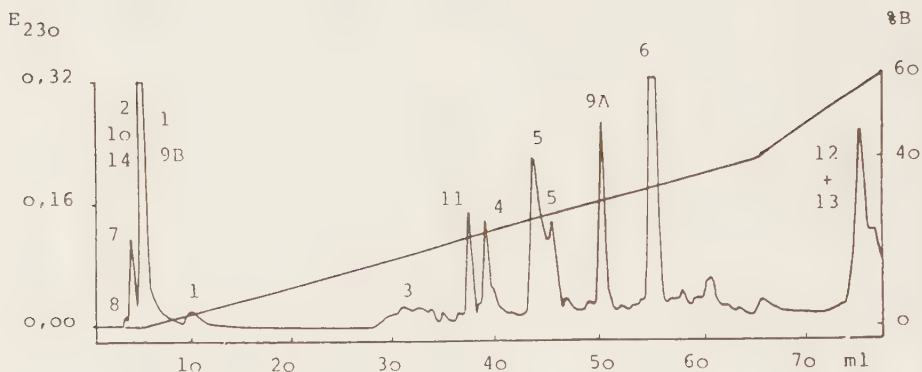


Diagramm 15

 Isolierung der tryptischen Peptide der α^A - Ketten des
 Mauersegleryoglobins mit dem HPLC - System.

Säule: RP - 2, 7 μ m LiChrosorb
 ($\emptyset$ 4,6 x 250 mm)
 Wässrige Phase: 0.05 M Ammoniumacetat
 Organisches Lösungsmittel: Acetonitril
 Durchfluß: 1 ml / min
 Gradient: 5 min isokratisch
 in 60 min auf 40 % B
 in 5 min auf 60 % B

Die Gipfel, welche mehrere Peptide enthielten, wurden mit einer Vydak RP - 18 Säule rechromatographiert. (s. Diagramm 16)

Tp 12 + 13 konnten, obzwar in Position 127 Lysin als Spaltstelle vorhanden ist, nicht getrennt werden, trotz verlängerter Oxydationszeit, längerer Spaltzeit, größerer Trypsinkonzentration. Alle 40 Aminosäurereste konnten mit der Hilfe des Propinprogrammes sequenziert werden.

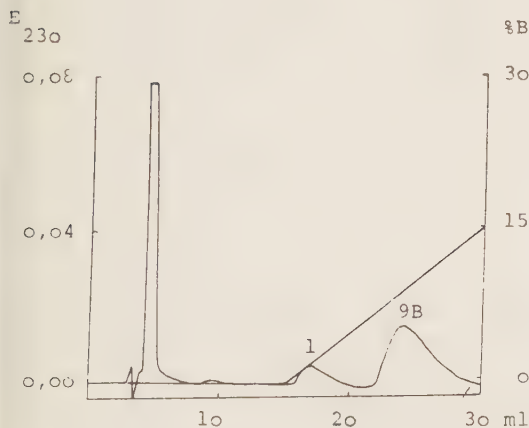


Diagramm 16

Trennung der tryptischen
Peptide Tp 1 + Tp 9B

Gradient: 15 min isokratisch
in 40 min auf 40 % B
in 5 min auf 60 % B

3.4. Tryptische Peptide der α^D - Ketten (s.III.1.5.)

Alle Gipfel, die mehrere Peptide enthielten, wurden mit einer Vydak RP - 18 Säule getrennt. (s.Diagramm 18)

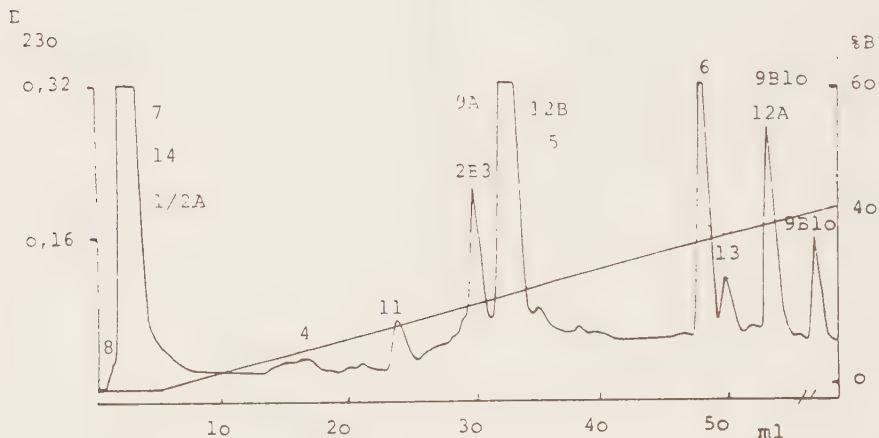


Diagramm 17

Isolierung der tryptischen Peptide der α^D - Kette des Mauersegleryoglobins mit dem HPLC - System.

Säule:	RP - 2, 7 μ m LiChrosorb ($\varnothing$ 4,6 x 250 mm).
Wässrige Phase:	0.05 M Ammoniumacetat
Organisches Lösungsmittel:	Acetonitril
Durchfluß:	1 ml / min
Gradient:	5 min isokratisch in 60 min auf 40 % B in 5 min auf 60 % B

Diagramm 18

Trennung der tryptischen
Peptide Tp 7, Tp 14, Tp 1/2A

Gradient: 10 min isokratisch
in 80 min 40 % B
in 10 min 60 % B

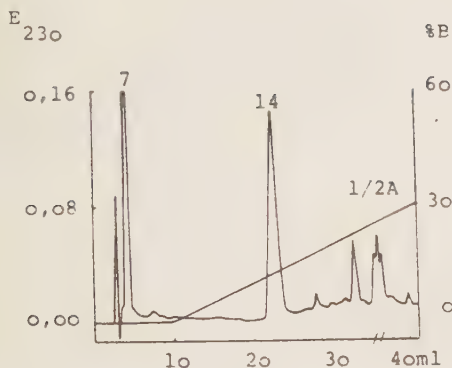
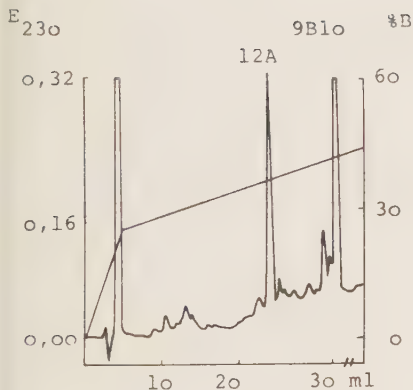


Diagramm 19

Trennung der tryptischen Peptide
Tp 12A + Tp 9B10 (Chymotryptisch)

Gradient: in 5 min auf 25 % B
in 60 min auf 60 % B



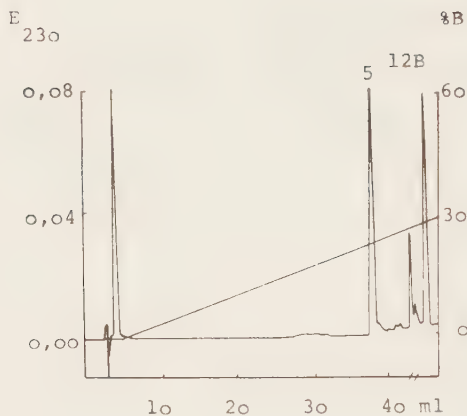


Diagramm 20

Trennung der tryptischen
Peptide Tp 5 + Tp 12B

Gradient: 5 min isokratisch
in 60 min 40 % B
in 5 min 60 % B

3.5. Tryptische Peptide der β - Ketten (s.III.1.6.1.)

Die tryptischen Peptide der β - Ketten des Mauerseglerglobins konnten, außer Tp 10 + Tp 11, mit einer RP - 2 Säule rein erhalten werden.

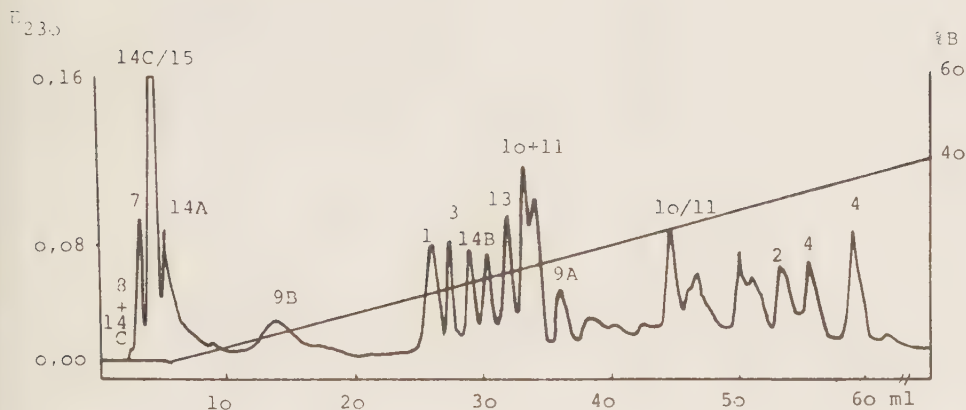


Diagramm 21

Isolierung der tryptischen Peptide der β - Ketten des Mauer-seglerglobins mit dem HPLC - System.

Säule:	RP - 2, 7 μ m LiChrosorb ($\varnothing$ 4,6 x 250 mm)
Wässrige Phase:	0.05 M Ammoniumacetat
Organisches Lösungsmittel:	Acetonitril
Durchfluß:	1 ml / min
Gradient:	5 min isokratisch
	in 60 min 40 % B
	in 5 min 60 % B

Tp 10 + Tp 11 wurden mit einer Vydak RP - 18 Säule getrennt.

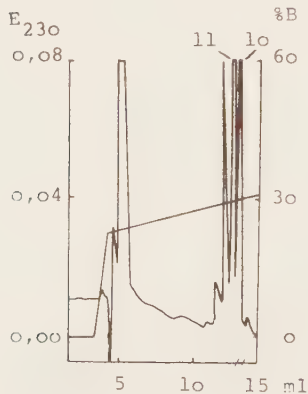


Diagramm 22

Trennung der tryptischen
Peptide Tp 10 + Tp 11

Gradient: 1 min isokratisch
in 2 min auf 25 % B
in 60 min auf 60 % B

Das Core konnte in 0.1 % - iger TFA gelöst und auf einer RP - 2 Säule getrennt werden.

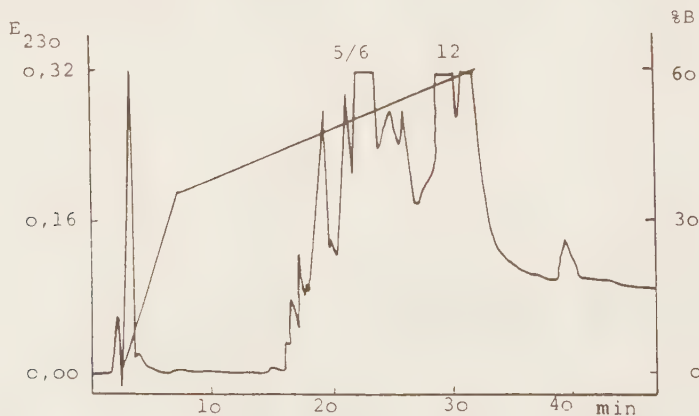


Diagramm 23

Trennung der tryptischen Core - Peptide

Tp 5/6 + Tp 12 der β - Kette des

Mauerseglglobins auf einer RP - 2 Säule

Säule:

RP - 2, 7 μ m LiChrosorb
(0 4,6 x 250 mm)

Wässrige Phase:

0.1 % TFA

Organisches Lösungsmittel: Acetonitril + 0,1 % TFA

Durchfluß:

1 ml / min

Gradient:

2 min isokratisch

in 5 min auf 35 % B

in 25 min auf 60 %

Tabelle 4

Analysen der tryptischen Peptide der α^A -Kette des Mauersegglobins

pos.	Tp 1 1-7	Tp 2 8-11	Tp 3 12-16	Tp 4 17-31	Tp 5 32-40	Tp 6 41-56	Tp 7 57-60	Tp 8 61	Tp 9A 62-82	Tp 9B 83-90	Tp 10 91-92	Tp 11 93-99	Tp 12 + 13 100-139	Tp 14 140-141	(S)	K
Asx	1.10	0.98	-	-	-	1.03	-	-	3.74	1.00	-	1.94	1.58 (1)	-	(11)	11.37
Thr	-	1.10	-	-	0.97	0.91	-	-	-	-	-	-	2.77	-	(6)	5.89
Ser	0.91	-	-	-	-	1.78	-	-	1.90	0.85	-	-	2.39 (2)	-	(8)	7.86
Glx	-	-	-	3.06	-	1.00	-	-	1.14	1.06	-	-	1.36 (1)	-	(7)	7.44
Pro	-	-	-	-	2.27	2.13	-	-	-	-	-	1.14	2.08	-	(7)	7.36
Gly	-	-	1.03	3.71	-	1.13	0.91	-	1.23	-	-	-	1.55 (1)	-	(9)	9.34
Ala	1.99	-	1.01	3.96	2.19	1.15	1.07	-	5.54 (6)	0.91	-	-	4.75 (5)	-	(23)	22.84
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.22	-	(2)	2.00
Val	0.89	0.75	1.04	-	-	0.92	-	-	2.00	-	-	1.85	5.63 [^] (7)	-	(15)	14.50
Met	-	-	-	-	0.54 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(1)	0.85
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)	
Ile	-	-	-	1.05	-	-	-	-	2.07	-	-	-	0.95	-	(4)	3.36
Leu	0.93	-	-	2.14	-	0.99	-	-	2.13	1.95	0.98	-	6.63 (7)	-	(16)	16.32
Tyr	-	-	-	-	0.89	0.77	-	-	-	-	-	-	-	0.94	(3)	2.90
Phe	-	-	0.92	-	0.94	1.88	-	-	-	-	-	0.98	2.17	-	(7)	6.78
Lys	1.17	1.15	0.97	-	1.18	1.07	1.12	1.00	1.21	1.12	-	1.08	2.19	-	(12)	11.88
His	-	-	-	-	-	1.19	0.89	-	-	1.08	-	-	3.67 (4)	-	(7)	7.45
Arg	-	-	-	1.06	-	-	-	-	-	-	1.19	-	-	1.05	(3)	3.03
Summe	7	4	5	15	9	16	4	1	21	8	2	7	40	2	141	

(S) = Summe der Aminosäuren

K = Kettenanalyse

Die in Klammern befindlichen Zahlen zeigen die Anzahl der Aminosäuren nach der Sequenzanalyse

[^] = Val-Val Bindung, die in der 20 h Analyse nicht aufgeht

Analysen der tryptischen Peptide der α^D -Kette des Mauersegglobins

Pos.	Tp 1/2A 1-8	Tp 2B3 9-16	Tp 4 17-31	Tp 5 32-40	Tp 6 41-56	Tp 7 57-60	Tp 8 61	Tp 9A 62-71	Tp 9B10 72-92	Tp 11 93-99	Tp 12A 100- 115	Tp 12B 116- 127	Tp 13 128- 139	Tp 14 140- 141	(S) K
Asx	0.92	1.12	- -	- -	1.99	- -	- -	- -	4.00	1.87	- -	2.13	- -	- -	(12) 11.95
Thr	1.02	- -	1.02	2.91	0.88	- -	- -	0.95	- -	- -	1.99	1.10	- -	- -	(10) 9.34
Ser	- -	- -	- -	- -	1.59 (2)	- -	- -	- -	3.47 (4)	- -	- -	- -	0.94	- -	(7) 7.32
Glx	0.99	1.70	4.91 (6)	1.11	0.99	- -	- -	- -	2.08	- -	2.13	1.04	1.24	- -	(17) 16.40
Pro	- -	- -	- -	1.27	2.24	- -	- -	- -	- -	0.97	- -	1.19	- -	- -	(5) 5.39
Gly	- -	- -	2.38 (2)	- -	1.14	2.00	- -	1.24	- -	- -	- -	- -	- -	- -	(6) 6.51
Ala	1.09	- -	1.24	- -	- -	- -	- -	2.89	2.16	- -	2.06	2.00	3.60 (4)	- -	(15) 14.50
Cys	- -	- -	0.99	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	0.99	- -	- -	- -	(2) 1.57
Val	- -	1.15	1.22	- -	- -	- -	- -	2.50 [~] (3)	- -	1.93	1.60 (2)	- -	1.92	- -	(11) 10.23
Met	0.91	- -	- -	0.89	- -	- -	- -	- -	- -	- -	0.97	- -	- -	- -	(3) 2.73
Trp	- -	0.71	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	(1) 0.78
Ile	- -	1.00	- -	- -	0.94	- -	- -	- -	- -	- -	- -	0.50 (1)	- -	- -	(3) 2.66
Leu	1.04	0.93	2.16	- -	1.18	- -	- -	1.04	5.99	- -	4.16	- -	2.23	- -	(18) 18.14
Tyr	- -	- -	- -	0.70	0.99	- -	- -	- -	1.01	- -	- -	0.91	- -	0.99	(5) 4.60
Phe	- -	- -	- -	1.00	2.02	- -	- -	- -	- -	0.98	- -	1.07	1.05	- -	(6) 5.78
Lys	1.56 (2)	1.35 (1)	- -	1.09	- -	1.02	1.00	1.36 (1)	- -	1.08	1.03	1.11	1.01	- -	(11) 10.83
His	- -	- -	- -	- -	1.09	0.97	- -	- -	1.22	- -	1.02	0.91	- -	- -	(5) 5.32
Arg	- -	- -	1.05	- -	0.90	- -	- -	- -	1.02	- -	- -	- -	- -	1.00	(4) 3.75
Summe	8	8	15	9	16	4	1	10	21	7	16	12	12	2	141

(S) = Summe der Aminosäuren

K = Kettenanalyse

Die in Klammern befindlichen Zahlen zeigen die Anzahl der Aminosäuren nach der Sequenzanalyse

[~] = Val-Val Bindung, die in der 20 h Analyse nicht aufgeht

Analysen der tryptischen Peptide der β - Kette des Mauersegglobins

Pos.	Tp 1 1-8	Tp 2 9-17	Tp 3 18-30	Tp 4 31-40	Tp 5/6 41-61	Tp 7 62-65	Tp 8 66	Tp 9A 67-76	Tp 9B 77-82	Tp 10 83-95 104	Tp 11 96-	Tp 12 105- 120	Tp 13 121- 132	Tp 14A 133- 135	Tp 14B 136- 143	Tp 14C 144	Tp 15 145- 146	(S)	K
Asx	-	-	2.19	-	2.05	-	-	-	1.94	1.14	2.01	1.31 (1)	0.92	-	-	-	-	(11)	10.71
Thr	1.21	0.94	-	0.97	1.03	-	-	1.00	-	0.91	-	-	0.81	-	-	-	-	(7)	6.69
Ser	-	-	-	-	3.06	-	-	1.02	0.97	1.71	-	0.70	-	-	-	-	-	(8)	8.30
Glx	2.42 (3)	1.32 (1)	1.14	1.13	-	-	-	1.22	-	1.64 (2)	0.81	-	3.08	-	-	-	-	(13)	12.18
Pro	-	-	-	1.39 (1)	1.30	-	-	-	-	-	1.15	-	1.35 (1)	-	-	-	-	(4)	4.31
Gly	-	2.14	1.13	-	2.10	1.06	-	1.09	-	-	-	1.00	-	-	-	-	-	(8)	8.43
Ala	1.15	-	3.71	-	2.95	0.91	-	1.26	-	1.00	-	2.11	3.01	-	3.74	-	-	(20)	20.45
Cys	-	-	0.82	-	-	-	-	-	-	1.03	-	-	-	-	-	-	-	(2)	2.24
Val	0.51 (1)	-	1.90	0.54 (1)	1.07 [^] (2)	-	-	1.47 [^] (2)	-	-	0.84	1.21	-	0.92	1.03	-	-	(12)	9.83
Met	-	-	-	-	0.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(1)	1.27
Trp	1.26	(1)*	-	(1)*	-	-	-	-	-	-	-	-	0.57 (1)	-	-	-	-	(4)	3.07
Ile	-	0.71	-	0.46 (1)	1.13	-	-	-	0.92	-	-	2.55 (3)	-	-	-	-	-	(7)	6.50
Leu	-	1.96	1.05	2.33 (2)	1.46 (1)	-	-	0.89	1.06	1.92	0.96	3.87	-	1.04	1.06	-	-	(17)	17.46
Tyr	-	-	-	1.01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.93	(2)	2.47
Phe	-	-	-	-	2.78	-	-	1.00	-	1.21	1.17	1.13	1.03	-	-	-	-	(8)	8.20
Lys	1.42 (1)	0.91	-	-	-	1.16	1.00	1.02	1.08	1.22	-	1.10	1.19	-	-	1.00	-	(10)	9.62
His	-	-	-	-	-	0.85	-	-	-	1.19	1.10	0.99	-	-	1.14	-	1.06	(6)	6.89
Arg	-	-	1.04	1.25	1.03	-	-	-	-	-	0.93	-	-	1.02	1.01	-	-	(6)	5.71
Summe	8	9	13	10	21	4	1	10	6	13	9	16	12	3	8	1	2		146

(S) = Summe der Aminosäuren

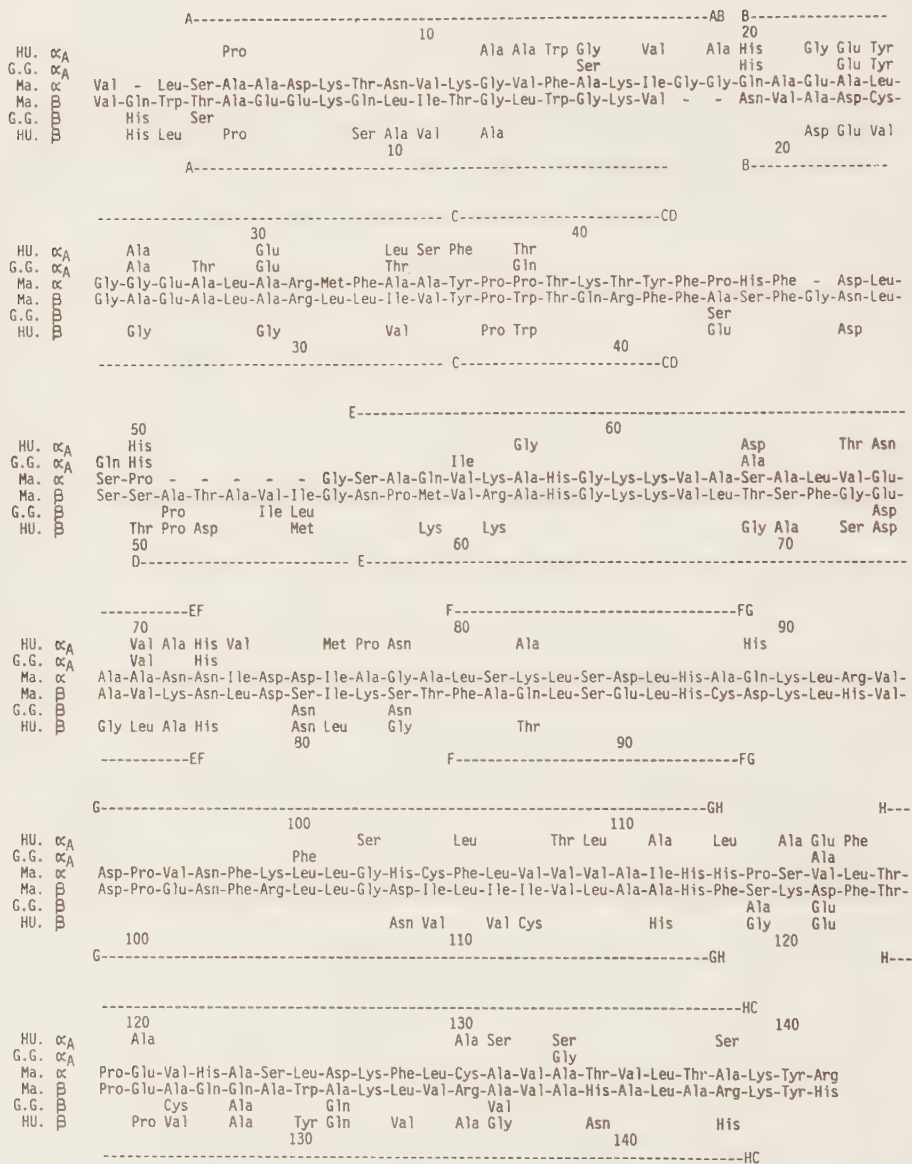
K = Kettenanalyse

Die in Klammern befindlichen Zahlen zeigen die Anzahl der Aminosäuren nach der Sequenzanalyse

() * = zerstörtes Trp

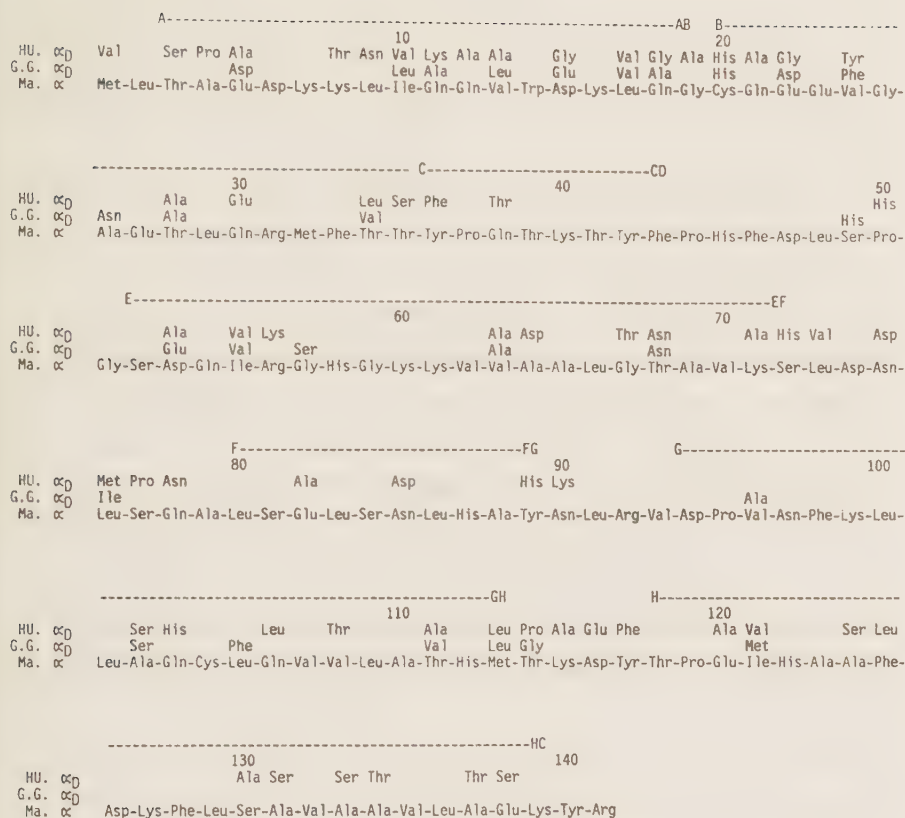
[^] = Val-Ile bzw. Val-Leu Bindung, die in der 20 h Analyse nicht aufgegangen ist

Abbildung 3



Aminosäuresequenz der α^A - und β - Ketten des Mauerseglers (*Apus apus*) im homologen Vergleich mit den α - und β - Globinketten des Menschen und den α^A - und β - Globinketten der Graugans

A-----AB etc. kennzeichnen helikale Bereiche.



Aminosäuresequenz der α^D - Ketten der Hämoglobinnebenkomponente HbD des Mauerseglers (*Apus apus*)
 im homologen Vergleich mit den α - Globinketten des Menschen und den α^D - Globinketten der Graugans
 A-----AB etc. kennzeichnen helikale Bereiche

IV. DISKUSSION

1. Schwarzdrossel

1.1. Biologie der Schwarzdrossel (*Merula merula*)

Die Sperlingsvögel umfassen mehr als $5/8$ aller Vogelarten (Grzimek et al. 1977). Die Schwarzdrossel gehört zur Ordnung der Sperlingsvögel (Passeriformes), Unterordnung Singvögel (Passeres), Familie Sänger (Muscicapidae), Unterfamilie Drosseln (Turdinae), Gattung *Merula* Boddaert, Art Schwarzdrossel (*Merula merula*) (nach Wolters 1975 - 1982).

Ihr Verbreitungsgebiet reicht von Nord - Afrika bis Mittel - Skandinavien, von den Kanarischen Inseln bis China. Sie lebt in Wäldern, Parks, Gärten, in menschlichen Siedlungen, auch sehr erfolgreich in Großstädten, wo sie ihr Verhalten, ihre Zuggewohnheiten geändert hat. Die Nahrung besteht aus Insekten, Regenwürmern, Schnecken, Beeren und Früchten. Die Schwarzdrossel ist Teilzieher. Ein Teil der Population zieht in wärmere Gebiete, der andere überwintert in unseren Breiten (Frese 1983). Diese unterschiedlichen Verhaltensweisen sind für das Überleben der Art von großem Nutzen. Um den Härten des Winters (Kälte, Futterknappheit) trotzen zu können, hat die Schwarzdrossel Adaptationsmechanismen entwickelt, die eine größere Überlebenschance ermöglichen:

- ein dichtes Federkleid, welches aufgeplustert besser wärmeisolierend wirkt (Frese 1983).
- Ansammeln einer winterlichen Fettreserve, welche die

Wärmeleitfähigkeit des Gewebes reduziert, hauptsächlich aber mit ihrem relativ hohen Energieinhalt eine gute Energiereserve darstellt. Individuen, die keine Möglichkeit zur Nahrungsaufnahme haben, aber eine Fettreserve von 15 g besitzen, können zwischen 2,2 und 4,6 Tagen überleben (Biebach 1977).

- Senkung der Körpertemperatur, die in engem Zusammenhang mit dem Gewichtsverlust einhergeht und eine Stoffwechselreduktion erlaubt. Die Temperaturdifferenz zwischen Ruhe- und Aktivitätsphase beträgt bei der Schwarzdrossel maximal $4,5^{\circ}\text{C}$. Die Stoffwechselreduktion erhöht die Überlebensdauer um eine zwanzigstündige Nachtperiode bei einer Umgebungstemperatur von 0°C . Die Schwarzdrossel zeigt Hypothermie, da mit fortschreitendem Hungern die Körpertemperatur in der Ruhepause über das normale Maß der tagesperiodischen Verringerung hinaus sinkt (Biebach 1977).

1.2. Sequenz der Ketten

Die Hämoglobine der Schwarzdrossel setzen sich aus einer Haupt- (HbA) und einer Nebenkompente (HbD) zusammen, die beide identische β - Ketten haben, sich jedoch in den α - Ketten unterscheiden. Zwischen α^A - und α^D - Ketten der Schwarzdrossel sind 68 Aminosäuren ausgetauscht (48,2 %). HbD wurde bei allen bis heute publizierten Vogelarten mit Ausnahme des Weißstorches (*Ciconia ciconia*) und des Ararauna (*Ara ararauna*) (Godovac - Zimmermann et al. 1984, 1985) gefunden, außerdem bei Schildkröten (Rücknagel et al. 1984). Die α^D - Ketten zeigen strukturelle Ähnlichkeit zu den embryonalen π - Ketten der Vögel (Chapman et al. 1981, 1982), ihre genetische Distanz zu den embryonalen Human - ξ - Ketten ist geringer als zu den α^A - Ketten (Czelusniak et al.). Die funktionelle Bedeutung des HbD ist unklar. Bei adulten Vögeln wird es meist in einem Prozentsatz von ca. 15 % gefunden (Borgese et al. 1965). Die Expression des α^D - Gens scheint im Verlaufe des Lebens eines Individuums zu schwanken. So wurde im Blut einer einjährigen Andengans (*Chloephaga melanoptera*) 40 % HbD gefunden, nach 3 Jahren bei demselben Individuum nur noch 4 % HbD (Hiebl 1987). Welche Faktoren hier eine Rolle spielen und ob dies ein Sonderfall war, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

1.2.1. Phosphatbindungsstellen (s. I. 1.)

Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse des adulten Humanhämoglobins und dem Vergleich mit den β - Ketten des Huhns (*Gallus gallus*) konnten die Phosphatbindungsstellen der Hämoglobine bei Vögeln gefunden werden (Arnone & Perutz 1974). Diese sind die gleichen wie bei Säugern, aber $\beta 143$ His ist durch Arg ersetzt. Zusätzlich sorgen $\beta 135$ Arg und $\beta 139$ His für eine Kompensation der negativen Ladungen. Für die Regulierung der O_2 - Affinität des Hämoglobins bei adulten Vögeln ist als organisches Phosphat IPP zuständig. 5 Phosphatgruppen binden mit 12 positiv geladenen Aminosäuren. In den β - Ketten der Schwarzdrossel ist $\beta 2$ His durch Gln ersetzt. Dieser Austausch wurde auch in der Hämoglobinsequenz des Feldsperling (Schneegans et al. 1985), Star (Oberthür et al. 1984) Strauß und Nandu (Oberthür et al. 1983) gefunden. Die stark positive Gruppe des His ist durch die schwach polare Seitenkette des Gln ersetzt, als Folge müßte die O_2 - Affinität erhöht sein.

Tab. I

Position	NA1	NA2	EF6	H13	H17	H21
beta	1	2	82	135	139	143
Human (DPG)	V	H	K	-	-	H
Vögel (IPP)	V	H,Q	K	R	H	R

1.2.2. Hämbindungsstellen

Tab. II

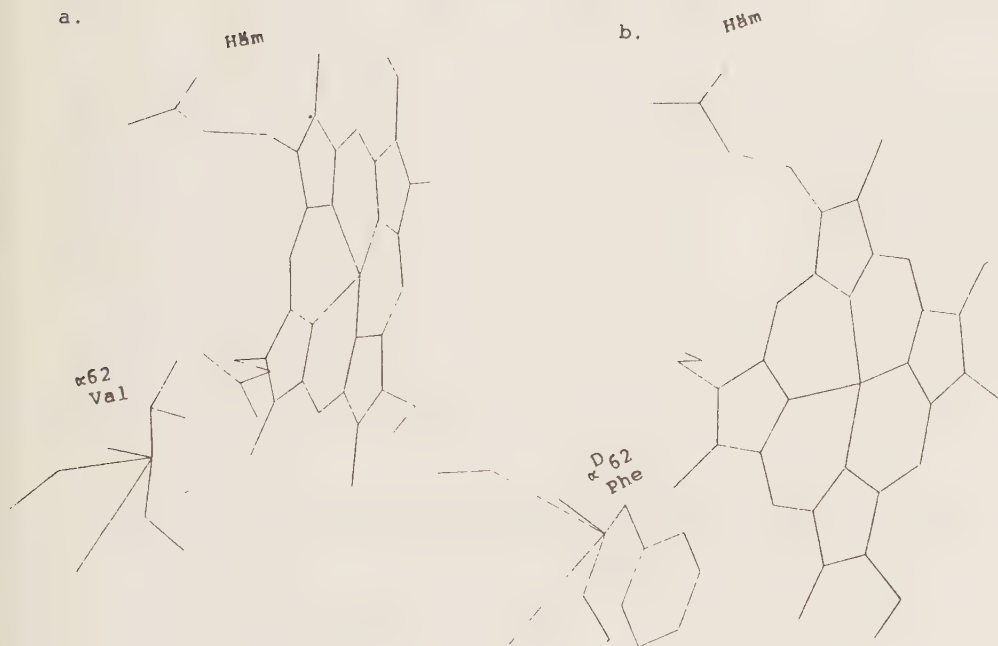
Pos.	HU.	Sch.D. A, D		Ma.* A, D		HU.	Sch.D.	Ma.*
C7	Y	Y	Y	Y	Y	F	F	F
CD1	F	F	F	F	F	F	F	F
CD3	H	H	H	H	H	S	S	S
CD4	F	F	F	F	F	F	F	F
E7	H	H	H	H	H	H	H	H
E10	K	K	K	K	K	K	K	K
E11	V	V	F	V	V	V	V	V
E14	A	A	A	A	A	A	S	S
E15	L	L	L	L	L	F	F	F
F1	L	L	L	L	L	F	F	F
F4	L	L	L	L	L	L	L	L
F7	L	L	L	L	L	L	L	L
F8	H	H	H	H	H	H	H	H
FG3	L	L	L	L	L	L	L	L
FG5	V	V	V	V	V	V	V	V
G4	N	N	N	N	N	N	N	N
G5	F	F	F	F	F	F	F	F
G8	L	L	L	L	L	L	L	L
H15	V	V	V	V	V	V	V	V
H19	L	L	L	L	L	L	L	L

Die Hämbindungsstellen des Deoxy - Hämoglobins des Menschen im Vergleich mit denen der Schwarzdrossel und denen des Mauerseglers (in Anlehnung an Fermi & Perutz 1981).

* - wird in 2.2.2. diskutiert

Die Hämkontakte sind im HbA der Schwarzdrossel wie bei allen bis heute publizierten Hämoglobinsequenzen der Vögel unverändert erhalten. Human - HbA hat in den β - Ketten in Pos. β 70 ein Ala, bei Vögeln ist es durch Ser (Einpunktmutation) ersetzt. So wird eine hydrophile (-OH) Gruppe eingeführt, was für die Hämbindung von geringer Bedeutung sein dürfte.

Im HbD der Schwarzdrossel ist in den α^D - Ketten die Hämkontaktstelle E11 Val durch Phe (Einpunktmutation) ersetzt worden. Um die Folgen dieses Austausches für den Erhalt dieser Bindungsstelle zu sehen, wurden mit Hilfe des PRODO Programms (Jones 1985) an einem Molecular Graphics Display, Evans & Sutherland PS 300, Strukturdiagramme erstellt.



Strukturdiagramm 1

a. Graphische Darstellung der Hämbindungsstelle $\alpha 62$ Val (Human HbA Deoxystruktur).

b. Graphische Darstellung desselben Bereiches mit $\alpha^D 62$ Phe (Sch.D. HbD Deoxystruktur).

Der Austausch der hydrophoben Aminosäure Val durch die hydrophobe Aminosäure Phe, erlaubt den Erhalt der van der Waals Bindung, die Kontaktstelle bleibt bestehen.

1.2.3. $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstellen

Tab. III

		α - Ketten				β - Ketten				
Pos.		Hu.	Sch.D.	Ma.*		Ma.*	Sch.D.	Hu.		Pos.
			A, D	A, D						
31	B12	R	R	R	R	A	Q	Q	H9	131
34	B15	L	A	Q	A	Q	A	A	H6	128
35	B16	S	T	S	A	Q	Q	Q	H5	127
36	C1	F	Y	Y	Y	E	D	P	H3	125
103	G10	H	Q	Q	H	P	P	P	H2	124
106	G13	L	L	Q	L	T	T	T	H1	123
107	G14	V	V	V	V	F	F	F	GH5	122
110	G17	A	A	A	A	S	G	G	GH2	119
111	G18	A	T	A	I	A	A	H	G18	116
114	GH2	P	P	G	P	A	A	A	G17	115
117	GH5	F	L	Y	L	I	V	C	G14	112
118	H1	T	T	S	T	D	D	N	G10	108
119	H2	P	P	P	P	I	L	M	D6	55
122	H5	H	H	H	H	Y	Y	Y	C1	35
123	H6	A	A	S	A	V	V	V	B16	34
126	H9	D	D	D	D	I	I	V	B15	33
						R	R	R	B12	30

Die $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstellen des Deoxy - Hämoglobins des Menschen im Vergleich mit denen der Schwarzdrossel und denen des Mauerseglers (in Anlehnung an Fermi & Perutz).

* - wird in 2.2.3. diskutiert.

$\alpha_1\beta_1$ - Kontakte sind sehr stabile Bindungen. Sie dienen der Bildung von Dimeren (s.I.1.). Durch die Gestaltsänderung des Moleküls beim Übergang zwischen der R - und T - Struktur werden sie kaum verändert. Die Mutationsrate an diesen Bindungsstellen ist relativ hoch. Die Funktionsfähigkeit des Hämoglobinmoleküls scheint durch die häufigen Austausche nicht sehr stark beeinflusst zu werden, es können jedoch O_2 - Affinitätsänderungen, durch Stabilisierung der Deoxy - oder Oxystruktur, die Folge sein.

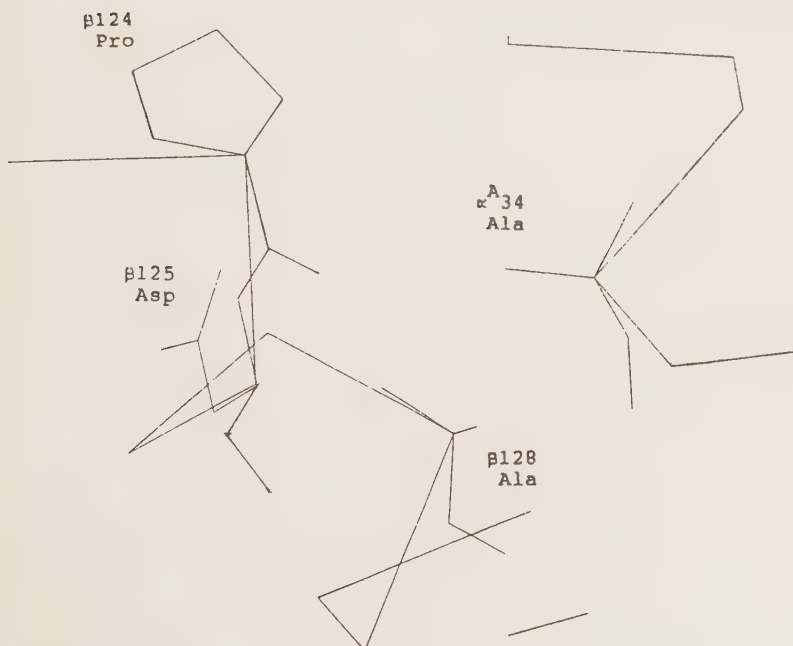
Die Austausche an den $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstellen werden anhand der Strukturdiagramme interpretiert.

a.

73



b.



s. folgende Seite!

Strukturdiagramm 2

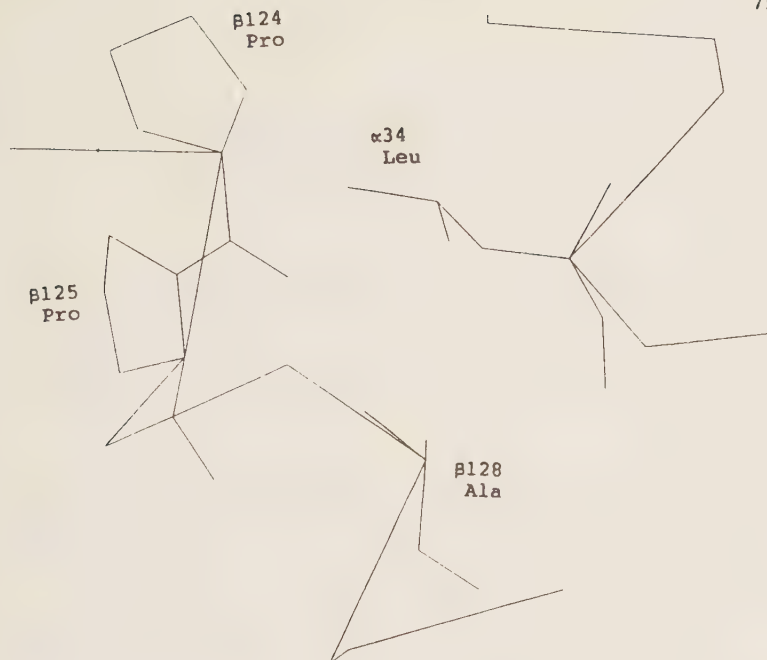
a. Graphische Darstellung der $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstellen α^{34} Leu mit β^{124} Pro, β^{125} Pro und β^{128} Ala (Deoxystruktur HbA Human).

b. Graphische Darstellung desselben Bereiches mit α^A_{34} Ala, β^{124} Pro, β^{125} Asp und β^{128} Ala (Deoxystruktur HbA Sch.D.).

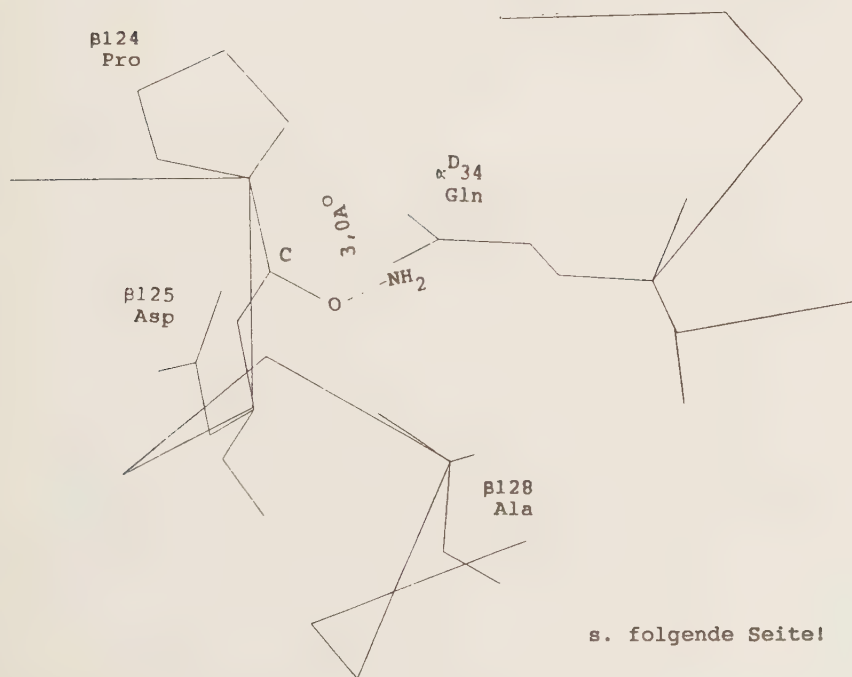
α^{34} Leu bildet hydrophobe Kontakte mit β^{124} Pro, β^{125} Pro und β^{128} Ala.

Mit α^A_{34} Ala (Zweipunktmutation) können die hydrophoben Wechselwirkungen erhalten bleiben, die Bindung wird wegen der größeren Entfernung etwas geschwächt. Der Austausch β^{125} Asp (Zweipunktmutation) bringt keine Änderung, da die Seitenkette der Bindungsstelle abgewandt ist.

a.



b.



s. folgende Seite!

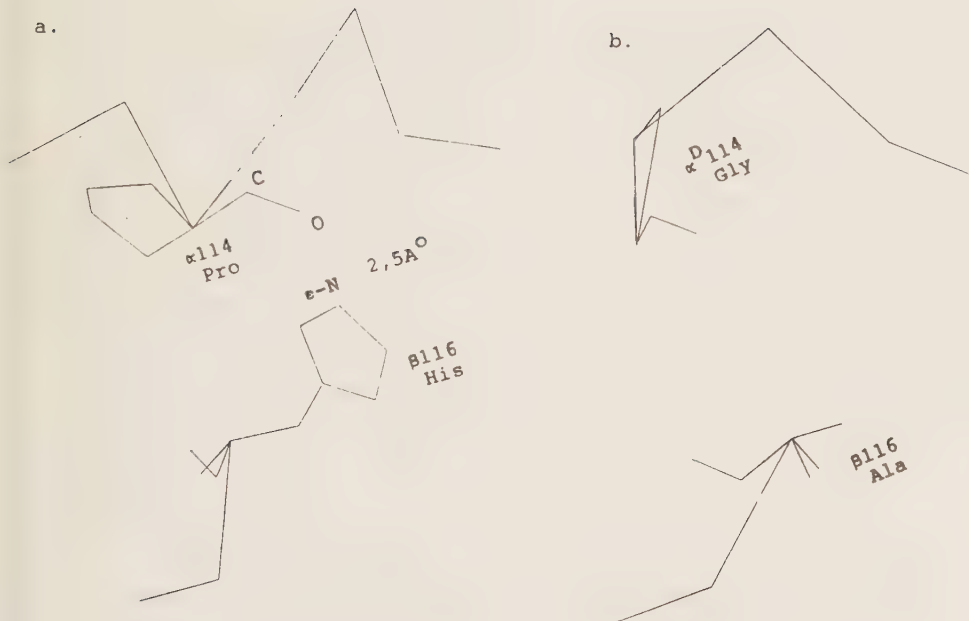
Strukturdiagramm 3

a. Graphische Darstellung der $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstellen α^{34} Leu mit β^{124} Pro, β^{125} Pro und β^{128} Ala (Deoxystruktur HbA Human).

b. Graphische Darstellung desselben Bereiches mit α^{D34} Gln, β^{124} Pro, β^{125} Asp und β^{128} Ala (Deoxystruktur HbD Sch.D.).

α^{34} Leu bildet hydrophobe Kontakte mit β^{124} Pro, β^{125} Pro und β^{128} Ala.

Mit α^{D34} Gln (Einpunktmutation) können keine hydrophoben Wechselwirkungen stattfinden. Es kommt aber zur Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der NH_2 - Gruppe von Gln und der CO - Gruppe der Peptidbindung von β^{124} Pro und β^{125} Asp (Zweipunktmutation). Diese Austausche bewirken eine Stabilisierung der Deoxystruktur.



Strukturdiagramm 4

a. Graphische Darstellung der α, β_1 - Bindungsstelle $\alpha 114$ Pro mit $\beta 116$ His (Deoxystruktur HbA¹ Human).

b. Graphische Darstellung desselben Bereiches mit $\alpha^D 114$ Gly und $\beta 116$ Ala (Deoxystruktur HbD Sch.D.).

Zwischen der CO - Gruppe des $\alpha 114$ Pro und dem $\epsilon - N$ von $\beta 116$ His wird eine Salzbrücke gebildet.

Mit $\alpha^D 114$ Gly (Zweipunktmutation) und $\beta 116$ Ala (Zweipunktmutation) fällt dieser Kontakt weg. Wegen des großen Abstandes ($> 4 \text{ \AA}$) kann auch keine Wasserstoffbrücke gebildet werden. Als Folge wird die Deoxystruktur destabilisiert.

1.2.4. $\alpha_1\beta_2$ - Bindungsstellen

Tab. IV.

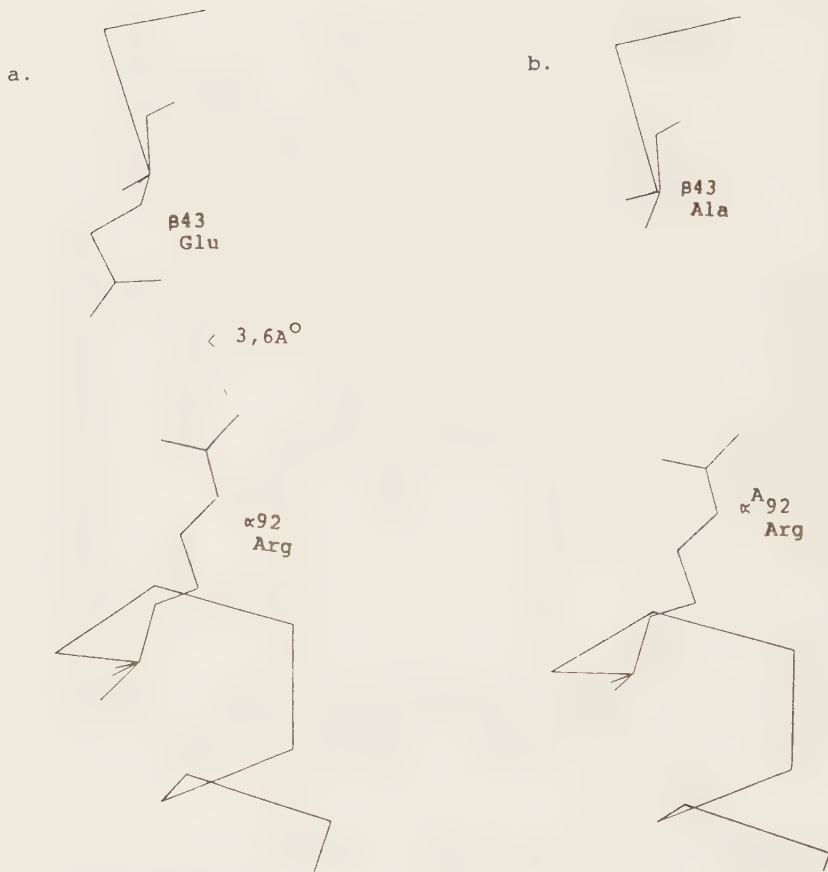
Pos.	α - Ketten					β - Ketten			Pos.
	Sch.D.		Ma.*			Ma.*		HU.	
	A, D		A, D						
37 C2	P	P	P	P	P	H	H	H	HC3 146
38 C3	T	Q	P	P	Q	Y	Y	Y	HC2 145
40 C5	K	K	K	K	K	L	L	L	G7 105
41 C6	T	T	T	T	T	N	N	N	G4 102
42 C7	Y	Y	Y	Y	Y	E	E	E	G3 101
44 CD2	P	P	P	P	P	P	P	P	G2 100
88 F9	A	A	A	A	A	D	D	D	G1 99
91 FG3	L	L	L	L	L	V	V	V	FG5 98
92 FG4	R	R	R	R	R	H	H	H	FG4 97
94 G1	D	D	D	D	D	A	A	E	CD2 43
95 G2	P	P	P	P	P	F	F	F	C7 41
96 G3	V	V	V	V	V	R	R	R	C6 40
97 G4	N	N	N	N	N	W	W	W	C3 37
140 HC2	Y	Y	Y	Y	Y	P	P	P	C2 36
141 HC3	R	R	R	R	R	Y	Y	Y	C1 35
						V	V	V	B16 34

Die $\alpha_1\beta_2$ - Bindungsstellen des Deoxy - Hämoglobins des Menschen im Vergleich mit denen der Schwarzdrossel und denen des Mauerseglers (in Anlehnung an Fermi & Perutz 1981).

* - wird in 2.2.4. diskutiert.

Die Bildung eines Tetramers aus Dimeren ist für die Funktion des Moleküls von großer Bedeutung (s.I.1.), deshalb ist die Mutationsrate an diesen Bindungsstellen sehr gering. In den α^A - , α^D - und β - Ketten der Schwarzdrossel ist je eine Aminosäure ausgetauscht. Die Substitution $\alpha_{38} \text{ Thr} \rightarrow \alpha_{38}^A \text{ Gln}$ ist auch bei anderen Vögeln und sogar in den embryonalen π - Ketten des Huhns und der Moschusente gefunden worden (nach Kleinschmidt & Sgouros 1987). Diese Hämoglobine besitzen eine erhöhte O_2 - Affinität. In den

α^D - Ketten finden wir an derselben Stelle α^D_{38} ein Pro. α_{38} bildet Kontakte mit β_{99} Asp, β_{100} Pro in der Deoxystruktur, mit β_{41} Phe, β_{97} His und β_{99} Asp in der Oxystruktur (Fermi & Perutz 1981). In Hämoglobinen mit α_{38} Thr oder Gln kann die Oxystruktur durch zwei Wasserstoffbrücken (mit Asp und His) besser stabilisiert werden als die Deoxystruktur (eine H - Brücke mit Asp). Wenn α_{38} Pro ist, wird das Gleichgewicht Richtung Deoxystruktur verlagert, was eine niedrigere O_2 - Affinität bedingt. Die Substitution β_{43} Glu $\rightarrow$ Ala wird mit Hilfe eines Strukturdiagrammes diskutiert.



Strukturdiagramm 5

a. Graphische Darstellung der $\alpha_1\beta_2$ - Bindungsstelle $\beta 43$ Glu mit $\alpha 92$ Arg (Deoxystruktur HbA Human).

b. Graphische Darstellung desselben Bereiches mit $\beta 43$ Ala und $\alpha 92$, $\alpha 92$ Arg (Deoxystruktur HbA, HbD Sch.D.)

Zwischen der CO - Gruppe von $\beta 43$ Glu und dem ϵ - N von $\alpha 92$ Arg bildet sich eine Salzbrücke. Dieser Kontakt fällt mit $\beta 43$ Ala (Einpunktmutation) weg, die Deoxystruktur könnte destabilisiert werden. In drei abnormalen Humanhämoglobinen wurde dieser Austausch gefunden (Bowman et al. 1964), der Phänotyp ist jedoch normal.

2. Mauersegler

2.1. Biologie des Mauerseglers (*Apus apus*)

Der Mauersegler gehört zur Ordnung der Segler (Apodiformes), Familie eigentliche Segler (Apodidae), Gattung *Apus* Scopoli, Art Mauersegler (*Apus apus*) (nach Wolters 1975 - 1982).

Sein Verbreitungsgebiet reicht von Nord - Afrika über ganz Europa bis Vorder - , Mittel - und Nord - Asien, ostwärts bis zur Mandschurei, Nord - und West - China, West - Himalaya. Er ist ein Zugvogel, der unsere Breiten nur in der Brutzeit von Anfang Mai bis Anfang August aufsucht. Die Nahrung des Mauerseglers besteht ausschließlich aus Kerb - und Spinnentieren, die er, immer im Fluge, mit weit geöffnetem Schnabel fängt. Er und seine Verwandten sind die am vollkommensten an das Luftleben angepassten Vögel. Sie sind ohne Rast an schönen Sommertagen 16 h unterwegs. Individuen, die keine Brut zu versorgen haben, verbringen sogar die Nacht im Fluge, in Höhen von 1000 - 3000 m N N. Die Wasseraufnahme, auch die Paarung kann im Fluge vollzogen werden (Koskiemies 1950), (Weitnauer 1983), (Grzimek et al. 1976). Der Mauersegler hat sehr lange, sichelförmig gebogene Flügel. Während des Fluges hat er einen niedrigen Metabolismus (39 cal/g/h) (Lyuleeva 1970, Hails 1979). Die extrem langen Flugzeiten bedingen jedoch einen großen Energieverbrauch, der durch die Aufnahme großer Futtermengen ausgeglichen wird. Während der Nachtruhe sinkt die Körpertemperatur von adulten Seglern oft von 41,8°C auf 36°C (Weitnauer 1983) und der Stoffwechsel wird reduziert. So kann durch

einen geringeren Energieverbrauch der Energiehaushalt ausgeglichen werden. Derselben Strategie, aber in ausgeprägterer Form, bedienen sich Kolibris (Ordnung Trochiliformes). Stammesgeschichtlich stehen diese der Ordnung Apodiformes sehr nahe (nach Wolters 1975 - 1982). Sie haben den höchsten Metabolismus aller Vertebraten (Johansen et al. 1987) und fallen in eine nächtliche Kältestarre. Ihre Körpertemperatur sinkt auf $25 - 20^{\circ}\text{C}$ (Berger & Johansen 1980), der Gesamtruheumsatz sinkt mit fallender Umgebungstemperatur (Prinzinger et al. 1986).

Mauersegler scheinen sehr kälteresistent zu sein. Dies ist eine wichtige Anpassung, die es ihnen erlaubt, in unseren Breiten erfolgreich zu brüten. Das Insektenangebot ist in den Schlechtwetterperioden im Sommer sehr gering. Adulte Vögel, die keine Brut zu versorgen haben, weichen in wärmere Zonen aus. Bei Nahrungsmangel fällt der Altvogel in einen Starrezustand, seine Körpertemperatur sinkt auf 36°C und bleibt einige Zeit auf diesem Niveau. Hält das Hungern längere Zeit an, so fällt die Temperatur unter 36°C und er stirbt nach 3 Tagen (Weitnauer 1980). Schon der Embryo im Ei kann überleben, wenn er zwei Tage nicht bebrütet wird. Frisch geschlüpfte Nestlinge können ohne Nahrung und ohne Wärme der Alttiere 2 - 3 Tage überleben (Lack 1973). Nestlinge zwischen 10 - 20 Tagen, die größere Fettreserven haben, überleben ohne Nahrung ca. eine Woche, bei einer Umgebungstemperatur von $11 - 14^{\circ}\text{C}$. Sie verfallen in eine Art Hungerschlaf. Es gibt auch Berichte, daß gut genährte Nestlinge damit drei Wochen lang überlebten, allerdings bei Um-

gebungstemperaturen von 24°C (Koskiemies 1948, 1950). Diese Ergebnisse wurden unter Versuchsbedingungen erzielt, da Nestlinge bei solchen Temperaturen nicht hungern müßten (Weitnauer 1980).

Der Torpor (Hibernation oder Dormancy) ist eine besondere Form der Stoffwechselanpassung bei Kälte und Hunger, der vermutlich vom ZNS ausgeht (Bartholomew et al. 1962). Er ist durch eine starke Verringerung des Stoffwechsels gekennzeichnet. So kann das Individuum unbeschadet längere Kälteperioden (die im Falle des Mauerseglers immer mit Nahrungsmangel gekoppelt sind) überleben. Die Art Mauersegler kann dank dieser Anpassung erfolgreich nördlichere Zonen besiedeln.

Symptome des Torpors beim Mauersegler:

- Verringerte Atemfrequenz
(von 90/min auf 20/min)
- Verringerte Herzfrequenz
- Gesenkte Körpertemperatur
(von ca. $41,5^{\circ}\text{C}$ auf minimal 20°C)
- Drastische Reduktion des Stoffwechsels
- Schlafähnlicher Zustand
- Auf externe Reize kann der Stoffwechsel gesteigert und die Körpertemperatur erhöht werden
- Nach dem Aufwachen treten keine Gesundheitsschäden auf

2.2. Sequenz der Ketten

Die Hämoglobine des Mauerseglers setzen sich aus einer Haupt - (HbA) und zwei Nebekomponenten (HbD und HbD') zusammen. HbD' ist instabil, es konnte nur in frisch aus Erythrozyten gewonnenem Hämoglobin nachgewiesen werden (s. IV. 2.2.b.). Die denaturierende Gelelektrophorese dieses Materials zeigte 4 Banden (s.IV.3.2.). Nach längerer Lagerungszeit konnte α^D nur noch als sehr schwache Bande nachgewiesen werden (s.IV.3.2. Bild 6), die nach der Kettentrennung des Globins über CM - Cellulose verschwand. Zwischen den α^A - und α^D - Ketten sind 60 Aminosäuren (42,5 %) ausgetauscht.

2.2.1. Phosphatbindungsstellen

Im Vergleich des Hämoglobins des Mauerseglers zu dem des Menschen ist eine Phosphatbindungsstelle $\beta 2\text{His} \rightarrow \text{Gln}$ ausgetauscht (s. IV.1.2.1.)

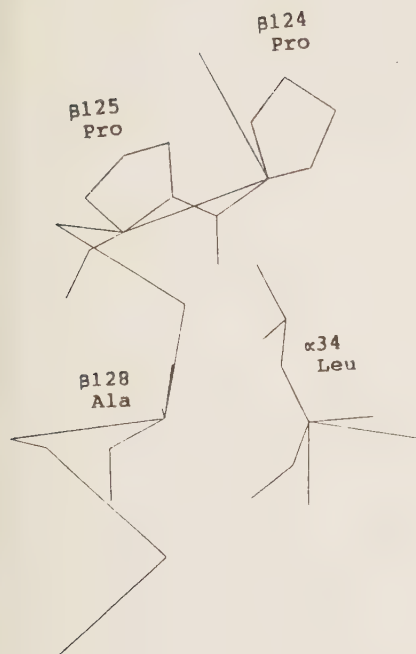
2.2.2. Hämbindungsstellen

In den α^A - und α^D - Ketten sind alle Hämkontakte unverändert erhalten. In den β - Ketten ist das im Humanhämoglobin Pos.70 gefundene Ala durch Ser ersetzt (s. IV. 1.2.2.) Dieser Austausch ist in allen sequenzierten Hämoglobinen von Vögeln zu finden, kommt aber auch bei einigen Säugern und Reptilien vor (nach Kleinschmidt & Sgouros 1987).

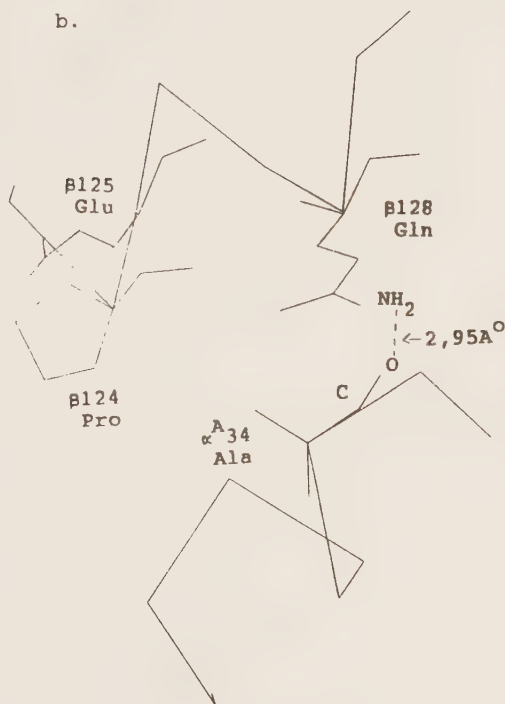
2.2.3. $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstellen

Die $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstellen des Hämoglobins des Mauerseglers sind in IV.1.2.3., Tab.III. aufgeführt und werden anschließend mit Hilfe von Strukturdiagrammen diskutiert.

a.



b.



s. folgende Seite!

Strukturdiagramm 6

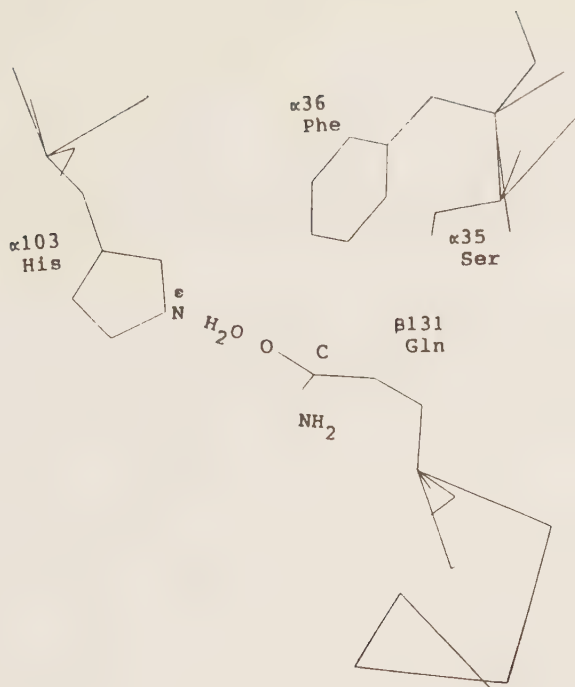
 a. Graphische Darstellung der $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstellen α^{34} Leu, mit β^{124} Pro, β^{125} Pro und β^{128} Ala (Deoxystruktur HbA Human).

b. Graphische Darstellung desselben Bereiches mit α^{A34} Ala, β^{124} Pro, β^{125} Glu und β^{128} Gln (Deoxystruktur HbA Ma.).

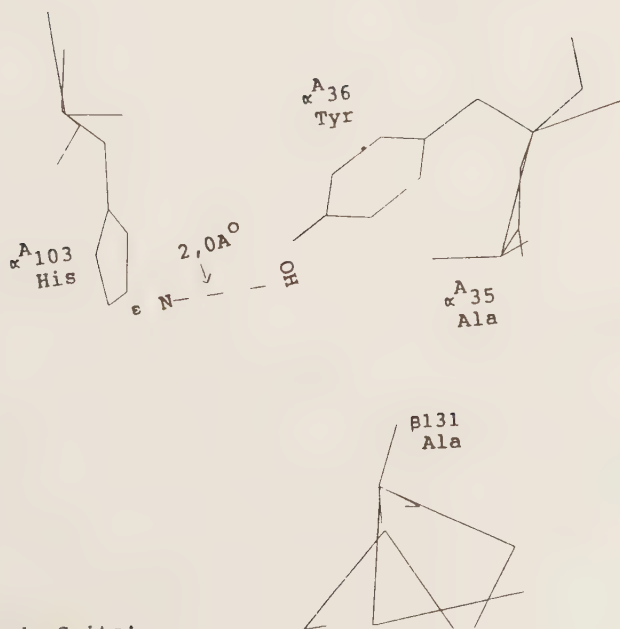
Im Humanhämoglobin kommt es in diesem Bereich zur Bildung einer hydrophoben Tasche. Diese kann im Hämoglobin des Mauerseglers nicht gebildet werden. Die NH_2 - Gruppe von β^{128} Gln (Zweipunktmutation) bildet mit der CO - Gruppe von α^{A34} Ala (Zweipunktmutation) eine Wasserstoffbrücke. Die Deoxystruktur könnte dadurch stabilisiert werden. Die Seitenketten von β^{125} Glu (Zweipunktmutation) sind für Bindungen zu weit.

a.

87



b.



s. folgende Seite!

Strukturdiagramm 7

a. Graphische Darstellung der $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstellen $\beta 131$ Gln mit $\alpha 35$ Ser, $\alpha 36$ Phe und $\alpha 103$ His (Deoxystruktur HbA Human).

b. Graphische Darstellung desselben Bereiches mit $\beta 131$ Ala (Zweipunktmutation), α^{A35} Ala (Einpunktmutation), α^{A36} Tyr (Einpunktmutation) und α^{A103} His (Deoxystruktur HbA Ma.).

Der mit Hilfe eines eingelagerten H_2O - Moleküls gebildete Kontakt zwischen dem ϵ - N des $\alpha 103$ His und der CO - Gruppe von $\beta 131$ Gln kann beim Mauersegler nicht zustandekommen. Es wird aber eine neue Bindungsstelle zwischen dem ϵ - N von α^{A103} His und der OH - Gruppe von α^{A36} Tyr gebildet.



b.



Strukturdiagramm 8

a. Graphische Darstellung des $\alpha\beta_1$ - Kontaktes α^{111} Ala mit β^{119} Gly (Deoxystruktur HbA Human).

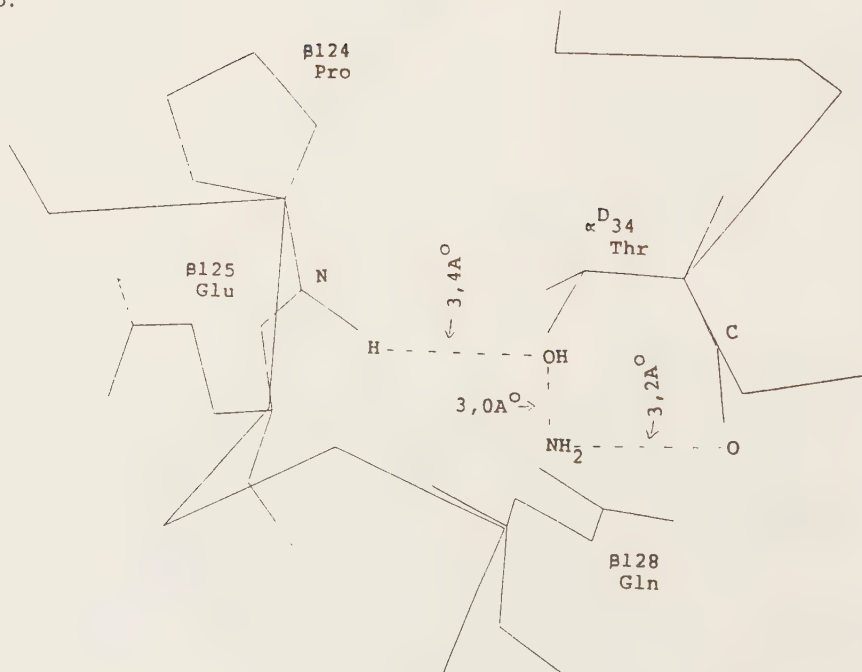
b. Graphische Darstellung desselben Bereiches mit α^{111} Ile (Zweipunktmutation) und β^{119} Ser (Einpunktmutation) (Deoxystruktur HbA Ma.).

Die zwischen α^{111} Ala und β^{119} Gly gebildete Wasserstoffbrücke ($3,9 \text{ \AA}$) kann mit α^{111} Ile und β^{119} Ser ($3,0 \text{ \AA}$) durch Verringerung des Abstandes die Deoxystruktur besser stabilisieren.

a.



b.



s. folgende Seite!

Strukturdiagramm 9

a. Graphische Darstellung der $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstellen α_{34} Leu mit β_{124} Pro, β_{125} Pro und β_{128} Ala (Deoxystruktur HbA Human).

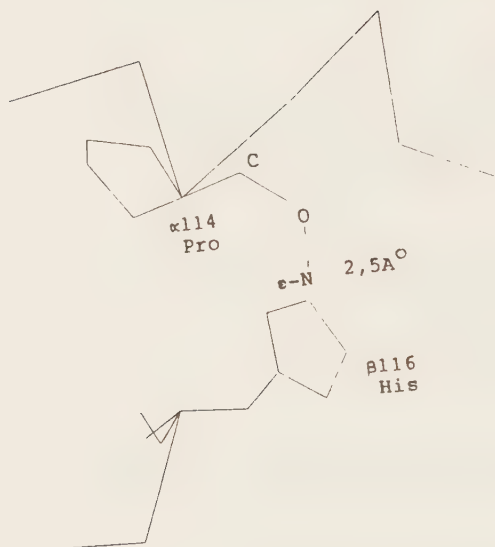
b. Graphische Darstellung desselben Bereiches mit α^D_{34} Thr (Zweipunktmutation), β_{124} Pro, β_{125} Glu (Zweipunktmutation) und β_{128} Gln (Zweipunktmutation) (Deoxystruktur HbD Ma.).

Die im Humanhämoglobin vorhandenen hydrophoben Wechselwirkungen können beim Mauersegler nicht zustandekommen. Es bilden sich aber drei Wasserstoffbrücken:

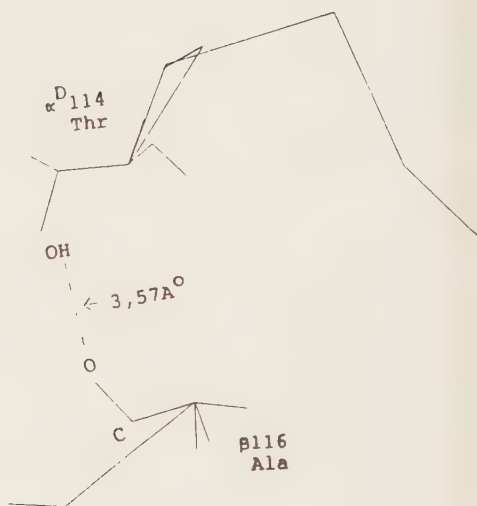
- zwischen der OH - Gruppe von α^D_{34} Thr und der NH - Gruppe von β_{125} Glu
- zwischen der OH - Gruppe von α^D_{34} Thr und der NH₂ - Gruppe von β_{128} Gln
- zwischen der NH₂ - Gruppe von β_{128} Gln und der CO - Gruppe von α^D_{34} Thr

Diese Bindungen könnten zu einer besseren Stabilisierung der Deoxystruktur führen.

a.



b.



Strukturdiagramm 10

a. Graphische Darstellung der $\alpha_1\beta_1$ - Bindungsstelle α_{114} Pro mit β_{116} His (Deoxystruktur HbA¹Human).

b. Graphische Darstellung desselben Bereiches mit α^D_{114} Thr (Einpunktmutation) und β_{116} Ala (Zweipunktmutation) (Deoxystruktur HbD Ma.).

Die im Falle a. gebildete Salzbrücke kann im Mauerseglerhämoglobin nicht mehr gebildet werden. Es kommt jedoch zur Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der CO - Gruppe von β_{116} Ala und der OH - Gruppe von α^D_{114} Thr. Diese Austausche könnten die Deoxystruktur destabilisieren.

2.2.4. $\alpha_1\beta_2$ - Bindungsstellen

In den α^A -, α^D - und β - Ketten des Mauerseglers ist je eine Aminosäure an einer $\alpha_1\beta_2$ - Bindungsstelle ausgetauscht (s. IV.1.2.4. Tab.IV). α_{38} Thr des Humanhämoglobins ist in den α^A - Ketten des Mauerseglers durch Pro ersetzt. Dies ist ein wichtiger Austausch, der in den bis heute sequenzierten Vogelhämoglobinen bei Greifvögeln (mit Ausnahme des Andenkondors), beim Huhn in den α^A - Ketten, beim Star und der Schwarzdrossel in den α^D - Ketten gefunden wurde. α_{38} liegt in der C - Helix (Pos. 36 - 42). Beim Übergang der Quartärstrukturen verschieben sich die Bereiche C α und FG β um 6 Å⁰ (Perutz 1983). In der T - Struktur lagert sich C6 α_{41} Thr in die Höhlung der Oberfläche der β - Ketten bei FG 5 β Val ein, in der R - Struktur C3 α_{38} Thr. α_{38} Pro führt zu einer sterischen Hinderung des Überganges beider Strukturen, die Deoxystruktur wird besser stabilisiert. Die T - Struktur hat eine höhere Affinität zu organischen Phosphaten, diese können besser binden und der O₂ kann leichter an die Gewebe abgegeben werden.

α_{38} Thr ist in den α^D - Ketten des Mauerseglers durch Gln ersetzt, was eine erhöhte O₂ - Affinität des HbD im Vergleich zum HbA erwarten läßt (s. auch IV.1.2.4.).

β_{43} Glu $\rightarrow$ Ala wurde schon bei der Sch.D. diskutiert (s. IV.1.2.4., Strukturdiagramm 5).

3. Molekulare Grundlagen der Anpassung an extreme Umweltbedingungen

In der Literatur sind viele Daten über O_2 - Affinitätsmessungen von Vogelhämoglobinen zu finden. Die $P_{50} - O_2$ Werte für dieselbe Spezies sind je nach Autor und verwendetem Meßverfahren sehr unterschiedlich. Der Erythrozyt ist bei Vögeln eine kernhaltige, metabolisch aktive Zelle. Dies könnte dazu führen, daß die O_2 - Affinität des Vogelblutes viel komplizierteren Regelmechanismen ausgesetzt ist als die des Blutes von Säugern (Lutz P. 1980). Mit denselben Meßmethoden wurden im Blute des Mauerseglers verschiedene O_2 - Affinitäten gefunden. Im Mai: $P_{50} - O_2$ von $44,6 \pm 1,8$, im Juni: $34,3 \pm 2,0$ (Palomeque et al. 1980). Danach scheinen auch jahreszeitliche Schwankungen eine Rolle zu spielen.

Es sind keine physiologischen O_2 - Affinitätsmessungen der Haupt- und Nebenkomponten des Hämoglobins des Mauerseglers und der Schwarzdrossel gemacht worden. Da keine Röntgenstruktur eines Vogelhämoglobins bekannt ist, wird im folgenden angenommen, daß das für das Humanhäoglobin entworfene Modell (Perutz et al. 1960) auch hier seine Gültigkeit hat.

Die Überlegungen berücksichtigen hauptsächlich die Primärstruktur der Schwarzdrossel - und Mauerseglerhämoglobine, als Hilfsmittel wurden die Strukturdiagramme (s. IV.) verwendet.

Sehr interessant sind die Austausche $\alpha 38$ (s. auch IV. 1.2.4. und IV. 2.2.4.)

Position	38
Ma. α^A	Pro
Sch.D. α^A	Gln
Ma. α^D	Gln
Sch.D. α^D	Pro

Physiologische Messungen der Hämoglobinkomponenten vom Sperbergeier (Hiebl 1987) zeigen, daß Komponenten mit $\alpha 38$ Pro eine niedrigere O_2 - Affinität haben als solche mit $\alpha 38$ Gln.

Der Vergleich zwischen HbA und HbD der Schwarzdrossel führt zu der Annahme, daß die Hauptkomponente eine höhere O_2 - Affinität besitzt als die Minorkomponente. Beim Mauersegler scheint HbA eine geringere O_2 - Affinität als HbD zu haben. Nach der Primärstruktur zu urteilen, sollte das Hämoglobin vom Mauersegler im Vergleich zu dem der Schwarzdrossel eine stärkere Stabilisierung der Deoxystruktur zeigen. Dies scheint eine sinnvolle Anpassung an das Phänomen des Torpors, auf molekularer Ebene, zu sein. Die Lungenventilation wird während des Torpors erheblich eingeschränkt, was eine Senkung des arteriellen O_2 - Partialdruckes bedingt. Von dieser Seite betrachtet, wäre ein Hämoglobin mit hoher O_2 - Affinität besser. Es ist aber bekannt, daß Hämoglobin bei niedrigen Temperaturen für O_2 affiner ist, ihn jedoch schwerer abgibt (Bunn et al. 1977). Auf diese erschwerte O_2 - Abgabe werden die bei künstlichen Unterkühlungen von Warmblütern unter $26^\circ C$ manchmal auftretenden Gewebsschädigungen

zurückgeführt (Scheunert & Trautmann 1976). Während des Torpors ist der Stoffwechsel stark reduziert. Wegen der eingeschränkten Verbrennungsprozesse benötigen die Zellen wenig O_2 . So muß das Hämoglobin auch nicht viel O_2 aufnehmen. Ein Hämoglobin mit geringerer O_2 - Affinität ist sinnvoller. Es gibt bei niedrigen Temperaturen leichter den O_2 ab und die Gewebsschädigung durch O_2 - Mangel wird verhindert.

Die bisher bekannte maximale Höhe, in der Mauersegler während ihres Fluges beobachtet werden konnten, sind 3500 m N N (Gustafson et al. 1977), das entspricht einem O_2 - Partialdruck von 103 Torr in trockener Luft (Bouverot 1985). Dies dürfte für die ausreichende O_2 - Aufnahme kein Problem darstellen. Da die Temperatur in den Lungen etwas niedriger ist als in metabolisch hochaktiven Organen, kann O_2 auch besser aufgenommen und bei höherer Temperatur leichter an die Gewebe abgegeben werden.

Die Schwarzdrossel ist nicht so gut an extreme Umweltbedingungen angepaßt (s. IV. 1. 1.). In ihrer natürlichen Umgebung muß sie kein Blut mit hoher oder niedriger O_2 - Affinität haben. Die mit Hilfe der Aminosäuresequenz gewonnenen Erkenntnisse scheinen dies zu bestätigen.

Unklar ist die Rolle des HbD. Nach der Primärstruktur zu urteilen, sollte es bei der Schwarzdrossel und dem Mauersegler eine andere O_2 - Affinität als HbA haben. Da es häufig in einem geringen Prozentsatz (15 %) gefunden wird, kann HbD die O_2 - Affinität des Blutes wohl auch nicht deutlich beeinflussen. Seine Konzentration schwankt aber (s. IV. 1.2.). Es ist hypothetisch denkbar, daß das α^D - Gen zu gewissen

Zeiten stärker aktiviert wird, die Konzentration von HbD steigt, und die O_2 - Affinität des Blutes so entscheidend verändert werden könnte.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit untersucht die Primärstruktur der Hämoglobine zweier adulter Vögel:

- Schwarzdrossel (*Merula merula*, Ordnung Passeriformes)
- Mauersegler (*Apus apus*, Ordnung Apodiformes)

Das Blut der adulten Schwarzdrossel enthält eine Haupt - ($\text{HbA} = \alpha^{\text{A}}_2\beta_2$) und eine Nebekomponente ($\text{HbD} = \alpha^{\text{D}}_2\beta_2$).

Das Blut des adulten Mauerseglers enthält eine Haupt - ($\text{HbA} = \alpha^{\text{A}}_2\beta_2$) und zwei Nebekomponenten ($\text{HbD} = \alpha^{\text{D}}_2\beta_2$ und HbD').

Die Existenz des HbD' konnte nur in frisch aus Erythrozythen gewonnenem Hämolysat und mit einer empfindlichen Methode der Komponententrennung mittels FPLC nachgewiesen werden.

Die Globinketten beider Vögel wurden auf einem Kationenaustauscher (CM - Cellulose) getrennt. Ihre Aminosäuresequenz wurde anhand tryptischer Peptide aufgeklärt. Die Zuordnung der Peptide der α^{A} -, α^{D} - und β - Ketten erfolgte durch Vergleich mit den Globinketten der Graugans (*Anser anser*).

Die Primärstruktur des HbA und des HbD beider Vögel wurde vollständig aufgeklärt.

Die Interpretation der Ergebnisse erfolgt durch Vergleich mit dem Humanhämoglobin. Die Austausche an den Häm -, Phosphat -, $\alpha_1\beta_1$ -, $\alpha_1\beta_2$ - Bindungsstellen werden mit Hilfe von Strukturdiagrammen und den bis heute bekannten Daten diskutiert. Anhand der Primärstruktur der sequenzierten Hämoglobine kann gesagt werden, daß das Hämoglobin des Mauerseglers eine niedrigere O_2 - Affinität als das der Schwarzdrossel hat. Dies ist auf molekularbiologischer Ebene eine Anpassung an das Phänomen des Torpors.

The Primary Structure of Two Adult Bird Hemoglobins:
 Blackbird (*Merula merula* L., 1758)
 Swift (*Apus apus* L., 1758)
 Molecular Aspects of Torpor

Summary

The present work considers the examination of the hemoglobins of two adult birds: blackbird and swift. The blood of the adult blackbird contains one major ($\text{HbA} = \alpha^{\text{A}}_2\beta_2$) and one minor ($\text{HbD} = \alpha^{\text{D}}_2\beta_2$) hemoglobin component, whereas that of swift one major (HbA) and two minor (HbD and HbD') components. HbD' could be detected only in freshly prepared hemolysate by means of a sensitive FPLC separation method. The globin chains of both birds were separated by chromatography on a cation exchanger (CM - cellulose). Their primary structures were determined by sequencing of the tryptic peptides. For the α^{A} -, α^{D} - and β - chains, peptide alignment was done by comparison with the corresponding chains of the greylag goose (*Anser anser*) and the complete sequences were determined. Interpretation of the results was done using human hemoglobin as a reference. Substitutions of possible structural significance were examined with the help of molecular graphics/modelling and discussed on the basis of known physiological data. From these studies it can be concluded that the hemoglobin of the swift should have a lower oxygen affinity than that of the blackbird. This could be interpreted as a molecular mechanism of adaptation to torpor.

La estructura de hemoglobina de aves adultos:

Mirlo común (*Merula merula*, L., 1758) y

Vencejo común (*Apus apus*, L., 1758)

El "torpor" de punto de vista molecular biológico

En el trabajo presentado se examina la estructura primaria de las hemoglobinas de dos especies aviares adultas: mirlo común (*Merula merula*, ordo Passeriformes) y vencejo común (*Apus apus*, ordo Apodiformes).

La sangre del mirlo común adulto contiene un compuesto principal ($HbA = \alpha^A_2\beta_2$) y un compuesto secundario ($HbD = \alpha^D_2\beta_2$), la del vencejo común adulto un compuesto principal ($HbA = \alpha^A_2\beta_2$) y dos compuestos secundarios ($HbD = \alpha^D_2\beta_2$ y HbD'). La existencia de HbD' se pudo demostrar solamente en hemolizado recién preparado de glóbulos rojos y con el método sensible de la separación de compuestos usando cromatografía líquida proteica rápida (FPLC). Las cadenas de globinas de los dos aves se separaron usando cambiador de cationes (CM - celulosa). La secuencia de sus aminoácidos se clasificó a través de sus peptidos disociados por tripsina. La clasificación de los peptidos de las cadenas α^A , α^D y β se logró por comparación con las cadenas de globina de ánsar común (*Anser anser*). La estructura primaria de HbA y de HbD de las dos especies aviares se clarearon completamente. La interpretación de los resultados se realizó por comparación con la hemoglobina humana. Se discuten las substitutiones de posible significancia estructural comparandolas con modelos ya conocidos y en base de los datos fisiológicos. Se concluye que la hemoglobina del vencejo tiene una capacidad inferior de fijación de oxígeno como el mirlo. Esto se puede interpretar como un mecanismo molecular de la adaptación al torpor.

VI. LITERATUR

Arnone A. (1972)

X - ray Diffraction Study of Binding of 2,3 - Diphosphoglycerate to Human Deoxyhaemoglobin
Nature (London) 237, S. 146 - 149

Arnone A., Perutz M. F. (1974)

Structure of inositol hexaphosphate - human deoxyhaemoglobin complex
Nature (London) 249, S. 34 - 36

Bartholomew G.A., Howell T.R., Hudson J.W. (1962)

Body temperature, oxygen consumption, evaporative water loss and heart rate in the poorwill
Condor 64, S. 117

Bartlett G. R. (1982)

Isolation and assay of red - cell inositol polyphosphates
Analytical Biochemistry 124, S. 425 - 431

Begg G., Rücknagel P., Godovac - Zimmermann J.,

Braunitzer G., Schuster W. (1986)

A Non - Commercial Gas Phase Sequenator: Experiences and Aspects
Biol. Chem. Hoppe Seyler 367, S. 81 - 94

Berger M., Johansen K. (1980)

Die Stadien der Kältestarre bei Kolibris-Anpassung von Atmung und Kreislauf
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 307

Biebach H. (1977)

Das Winterfett der Amsel (Turdus merula)
J. Orn. 118, S. 117 - 133

Biebach H. (1977)

Reduktion des Energiestoffwechsels und der Körpertemperatur hungernder Amseln (Turdus merula)
J. Orn. 118, S. 294 - 300

Bohr C., Hasselbalch K. A. und Krogh A. (1904)

Über einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluß, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt.
Skand. Arch. f. Physiol. 16, S. 402

Borgese T. A., Bertles J. F. (1965)

Hemoglobin Heterogeneity: Embryonic Hemoglobin in the Duckling and Its Disappearance in the Adult
Science 148, S. 509 - 511

Bouverot P. (1985)

Adaptation to Altitude - Hypoxia in Vertebrates
Springer - Verlag Berlin Heidelberg New-York Tokyo

Bowman B. H., Oliver C. P., Barnett D. R.,

Cunningham J. E. & Schneider R. G. (1964)

Chemical Characterisation of Three Hemoglobins - G.
Blood 23, S. 193 - 199

Braunitzer G., Gehring - Müller R., Hilschmann N.,

Hilse K., Hobom G., Rudloff V., Wittmann - Liebold B. (1961)

Die Konstitution des normalen adulten
Human - Hämoglobins
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 325, S. 283

Braunitzer G., Hilschmann N., Rudloff V., Hilse K.,

Liebold B., Müller R. (1961)

The haemoglobin particles (chemical and genetic aspects
of their structure)
Nature (London) 190, S. 480

Braunitzer G., Schrank B. (1970)

3 - Dimethylamino - 1 - propin als Puffersubstanz
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 351, S. 417

Braunitzer G., Schrank B., Ruhfus A. (1971)

Zur vollständigen automatischen Sequenzanalyse
von Peptiden mit Quadrol
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 352, S. 1730 - 1732

Braunitzer G., Schrank B., Stangl A., Bauer C. (1977)

Die Regulation der Höhenatmung und ihre molekulare
Deutung: Die Sequenz der β - Ketten der Hämoglobine deÄBs Schweines und des Lamas
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 358, S. 921 - 925

Braunitzer G., Schrank B., Stangl A., Bauer Ch. (1978)

Phosphat/Protein - Wechselwirkung und die Atmung
des Lamas, des menschlichen Fötus und die des Pferdes
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 359, S. 547 - 558

Braunitzer G., Jelkmann W., Stangl A., Schrank B.,
Krombach C. (1982)

Die primäre Struktur des Hämoglobins des indischen
Elefanten (*Elephas maximus*) (Proboscidea). β = Asn
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 363, S. 683 - 691

Braunitzer G., Stangl A., Schrank B., Krombach C.,
Wiesner H. (1984)

The Primary Structure of the Haemoglobin of the
African Elephant (*Loxodonta africana*, Proboscidea):
Asparagine in Position 2 of the β Chain
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 365, S. 743 - 749

Buddecke E. (1980)

Grundriß der Biochemie
Berlin, New - York
S. 251 - 255

Bunn H. F., Forget B. G. (1977)

Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects
W. B. Saunders Company, Philadelphia

Buse G., Braig S., Braunitzer G. (1969)

Die Konstitution einer Hämoglobinkomponente
der Insekten
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 349, S. 1686 - 1690

Chapman B. S., Tobin A. I., Hood L. E. (1981)

Complete Amino Acid Sequences of the Major Early
Embryonic α - Like Globins of the Chicken
J. of Biol. Chem. 255, S. 9051 - 9059

Chapman B. S., Tobin A. I., Hood L. E. (1982)

Minor early embryonic chicken Hemoglobin M
J. of Biol. Chem. 257, S. 651 - 658

Clegg G. B., Naughton M. A., Weatherall D. J. (1966)

Abnormal Human Haemoglobins Separation and Characteri-
zation of the α and β Chains by Chromatography
and Determination of Two New Variants, Hb Chesapeake
and Hb J (Bangkok)
J. Mol. Biol. 19, S. 91 - 108

Czelusniak J., Goodman M., Hewett - Emmet D., Weiss M. C.

Venta P. J. & Tashian R. E. (1982)

Phylogenetic origins and adaptive evolution of avian
and mammalian haemoglobin genes
Nature 298, S. 297 - 300

Dagliesh C. E. (1952)

The relation between pyridoxin and tryptophan
metabolism, studied in the rat
Biochem. J. 52, S. 3

Davis B. J. (1964)

Disk Electrophoresis II.
Method and Application to Human Serum Proteins
Am. N. Y. Acad. Sci. 121, S. 404 - 427

Dickerson K., Geis I. (1983)

Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology
The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.

Dobzhansky Th., Ayala F. J., Strebbins L. G.

Valentine J. W. (1977)

Evolution
Freeman W. H. and Comp.

Edmann P., Begg G. (1967)

A Protein Sequenator
Eur. J. Biochem. 1, S. 80 - 91

Fermi G., Perutz M. F. (1981)

Atlas of Molecular Structures in Biology
2. Haemoglobin and myoglobin
Clarendon Press Oxford

Frank H., Petersen H. (1955)

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung von
Histidin in der Papierchromatographie
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 299, S. 1

Frese W., (1983)

Amsel sträubt sich gegen Kälte
MPG Presseinformation (PIR) Heft 2, S. 2 - 3

Godovac - Zimmermann, Braunitzer G. (1984)

Hemoglobin of the adult White Stork (Ciconia
ciconia, Ciconiiformes)
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 365, S. 1107 - 1113)

Godovac - Zimmermann, Braunitzer G. (1985)

The Primary Structure of α^A and β Chains
from the Blue - and - Yellow Macaw (Ara ararauna,
Psittaci) Hemoglobin
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 366, S. 503 - 508

Gottlieb A. I., Itano H. A. (1963)

Blocking of tryptic cleavage of arginyl bonds by the
chemical modification of the guanid group with benzil
J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, S. 405

Grzimek B., Meise W., Niethammer G., Steinbacher J. (1976)

Vögel 2
Kindler Verlag, Bd. 8, Kap. 14

Grzimek B., Meise W., Niethammer G., Steinbacher J. (1977)

Vögel 3
Kindler Verlag, Bd. 9, Kap. 12

Guidotti G., Hill R. I., Königsberg W. (1962)

Structure of Human Hemoglobin
II. Separation and Amino Acid Composition of the Tryptic
Peptides from the α and β Chains
J. Biol. Chem. 237, S. 2184 - 2195

Gustafson T., Lindkvist B., Gotborn L. & Gyllin R. (1977)

Altitudes and flight times for swifts *Apus apus* L.
Ornis. Scand. 8, S. 87 - 95

Hall F. G., Dill D. B., Guzman Barron E. S. (1936)

Comparative Physiology in high altitudes
J. Comp. Cell. Physiol. 8, S. 301 - 313

Hails C.J. (1979)

A comparison of flight energetics in hirundines and
other birds
Comp. Biochem. Physiol. 63A, S. 581 - 585

Heath D., Williams D. R. (1981)

Man at High Altitude
The Pathophysiology of Acclimatisation and Adaptation
Churchill Livingstone, Edinburgh

Hiebl I. E. (1987)

Molekulare Grundlagen der Höhenatmung der Andengans
und des Sperbergeiers
Dissertat. Fak. Chem. u. Pharma. d. L. M. U. München

Hirs C. W. H. (1956)

The Oxidation of Ribonuclease with Performic Acid
J. Biol. Chem. 219, S. 611 - 621

Honig G. R., Adams III J. G. (1986)

Human Hemoglobin Genetics
Springer Verlag Wien

Hunkapillar M. W., Hewick R. M., Dreyer W. I.,

Hood L. E. (1983)

High - Sensitivity Sequencing with a Gas - Phase
Sequenator
Methods Enzymol. 91, S. 399 - 413

Imai K. (1982)

Allosteric effects in haemoglobin
Cambridge University Press

Ingram V. M. (1956)

A specific chemical difference between the globins
of normal human and sickle cell anaemia haemoglobin
Nature 178, S. 792 - 794

Johansen K., Berger M., Bicudo J. E. P. W., Ruschi A., and

DE Almeida P. J. (1987)

Respiratory properties of blood and myoglobin in
hummingbirds
Physiol. zool. 60, Heft 2, S. 269 - 278

Jones T. A. (1985)

Interactive Computer Graphics: Frodo
Methods Enzymol. 115, S. 157 - 171

Karlson P. (1980)

Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Georg Thieme Verlag Stuttgart - New-York, Kap. 4

Kleinschmidt T., de Jong W., Braunitzer G. (1982)

Die Primärstruktur der α - Ketten des Hämoglobin
vom Gürteltier (*Dasypus novemcinctus*, Edentata)
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 363, S. 239 - 245

Kleinschmidt T., Sgouros J. G. (1987)

Hemoglobin Sequences
Biol. Chem. Hoppe - Seyler 368, S. 579 - 615

Koskiemies J. (1948)

On temperature regulation and metabolism in the swift
Microtus apus L., during fasting
Experientia 4, S. 274 - 276

Koskiemies J. (1950)

The life of the swift, *Microtus apus* (L.), in relation
to the weather
Ann. Acad. Scient. Fennicae, A IV 15, S. 1 - 151

Kratzin H., Young C., Krusche J. U., Hilschmann N. (1980)

 Präparative Auftrennung des tryptischen Hydrolysates
 eines Proteins mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie
 Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 361, S. 1591 - 1598

Lack D. (1973)

 Swifts in a Tower
 Chapman & Hall. London

Layborne R. C. (1974)

 Collision between a Vulture and a aircraft at an
 altitude of 37,000 feet
 Wilson Bull. 86, S. 461 - 462

Linzen B. (1986)

 Invertebrate Oxygen Carriers
 Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New - York

Lottspeich F. (1980)

 Identification of the Phenylhydantoin Derivatives of
 Amino Acids by High Pressure Liquid Chromatography
 Using a Ternary, Isocratic Solvent System
 Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 361, S. 1829 - 1834

Lutz P. L. (1980)

 On the Oxygen Affinity of Bird Blood
 Amer. Zool. 20, S. 187 - 198

Lyuleeva D.S. (1970)

 Energy of flight in swallows and swifts
 Dok. Akad. Nauk. tadzhik SSR 190, S. 1467 - 1469

Marshall P.T.; Hughes G.M. (1973)

 Die Physiologie der Säugetiere und anderer Wirbeltiere
 Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart

Masur G., Braunitzer G., Wright P. G. (1982)

 Die Primärstruktur des Hämoglobins vom Breitmaul-
 nashorn (*Ceratotherium simum*, *Perissodactyla*): $\beta 2$ Asn
 Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 363, S. 1077 - 1085

Matsubara H., Sasaki R. M. (1969)

 High Recovery of Tryptophan from Acid Hydrolysates
 of Proteins
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, S. 175 - 181

Morpurgo G., Arese P., Bosia A., Pescarenona G. P.,

Luzzana M., Modiano G. & Krishma Ranjit S. (1976)

Sherpas living at high altitude

A new pattern of adaptation

Proceedings of the National Academy of Sciences of the
United States of America 73, S. 747

Oberthür W., Braunitzer G., Baumann R.

und Wright P. G. (1983)

Die Primärstruktur der α - und β - Ketten der

Hauptkomponenten der Hämoglobine des Straußes (*Struthio
camelus*) und des Nandus (*Rhea americana*) (*Struthioformes*)

Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 364, S. 119 - 134

Oberthür W., Braunitzer G., Würdinger I. (1982)

Das Hämoglobin der Streifengans

Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 363, S. 581 - 590

Oberthür W., Braunitzer G. (1984)

Hämoglobine vom Gemeinen Star

(*Sturnus vulgaris*, *Passeriformes*)

Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 365, S. 159 - 173

Palomeque J., Rodriguez J.D., Palacios L., Planas J. (1980)

BLOOD RESPIRATORY PROPERTIES OF SWIFTS

Comp. Biochem. Physiol. 67A, S. 91 - 95

Pauly H. (1915)

Zur Kenntnis der Diazoreaktion des Eiweisses

Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 94, S. 284 - 290

Perutz M. F., Rossmann M. G., Cullis A. F., Muirhead H.,

Will G., Worth A. C. T. (1960)

Structure of Haemoglobin

Nature 185, S. 416

Perutz M. F., Muirhead H., Cose J. M.,

Godman L. C. D. (1968)

Three - Dimensional Fourier Synthesis of Horse Oxy -
Haemoglobin at 2,8 Å⁰ Resolution: The Atomic Model

Nature 219, S. 131 - 139

Perutz M. F. (1969)

The Haemoglobin molecule
Proc. Roy. Soc. B 173, S. 113 - 140

Perutz M. F. (1976)

Structure and mechanism of haemoglobin
British Medical Bulletin 32, S. 195 - 208

Perutz M. F., Fermi G. (1981)

Hemoglobin and Myoglobin
Atlas of Molecular Structures of Biology
Richards F. M., Oxford University Press, N. Y.

Perutz M. F., Brunori M. (1982)

Stereochemistry of cooperative effects in fish
and amphibian haemoglobins
Nature (London) 299, S. 421 - 426

Perutz M. F. (1983)

Species Adaptation in a Protein Molecule
Mol. Biol. Evol. 1, S. 1 - 28

Petschow D., Würdinger I., Baumann R., Duhn I.,

Braunitzer G., Bauer C., (1977)

Causes of high blood O_2 affinity of animals
living at high altitude
J. Appl. Physiol. Respirat. Environ.
Exercise Physiol. 42, S. 139 - 143

Pfletschinger J., Braunitzer G. (1980)

Kovalente, C - terminale Hydrophilisierung von Brom-
cyanpeptiden mit Arginin im Sequenator
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 361, S. 925 - 931

Prinzinger R., Lübken I., Jackel S. (1986)

Vergleichende Untersuchungen zum Energiestoffwechsel
bei Kolibris und Nektarvögeln
J. Orn. 127, Heft 3 S. 303 - 313

Rapoport S., Guest G. M. (1941)

Distribution of Acid - soluble Phosphores in
Blood cells of various Vertebrates
J. Biol. Chem. 138, S. 269 - 282

Rollema H. S., Bauer C. (1979)

The interaction of inositol pentaphosphate with the
hemoglobins of highland and lowland geese
The Journal of Biological
Chemistry 254 S. 12038 - 12043

Rossi - Fanelli A., Antonini E., Caputo A. (1958)

Studies on the Structure of Hemoglobin
I. Physicochemical Properties of Human Globin
Biochim. Biophys. Acta 30, S. 608 - 615

Rovera G., Magarian C., Borun T. W. (1978)

Resolution of Hemoglobin Subunits by Electrophoresis
in Acid Urea Polyacrylamid Gels Containing Triton X 100
Anal. Biochem. 85, S. 506 - 518

Rücknagel K. P., Reischl E. & Braunitzer G. (1984)

Expression von α^D Genen bei Schildkröten
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 365, S. 1136 - 1171

Rudloff V., Zelenik M., Braunitzer G. (1966)

Zur Phylogenie des Hämoglobinmoleküls
Untersuchungen am Hämoglobin des Flußneunauges
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chemie 344, S. 284 - 288

Russu I. M., Chien Ho (1986)

Assessment of Roles of β 146 Histidyl Residues in the
Bohr Effect of Human Normal Adult Hemoglobin
Biochemistry 25, S. 1706 - 1716

Scheer T.B. (1969)

Tierphysiologie
Gustav Fischer Verlag Stuttgart

Scheunert A., Trautmann A. (1976)

Lehrbuch der Veterinär - Physiologie
Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg

Schneegans D., Braunitzer G., Oberthür W.,

Kösters J. und Grimm F. (1985)

Die Hämoglobine des Feldsperlings
(Passer montanus, Passeriformes)
Biol. Chem. Hoppe - Seyler 366, S. 893 - 899

Schroeder W. A., Shelton J. R., Shelton J. B.,

Cornik J., Jones R. T. (1963)

The amino acid sequence of the ϵ - chain
of human fetal hemoglobin
Biochemistry 2, S. 992 - 1008

Spackman D. H., Stein W. H., Moore S. (1958)

Automatic Recording Apparatus for Use in the
Chromatography of Amino Acids
Anal. Chem. 30, S. 1190 - 1206

Stryer L. (1979)

Biochemie
Vieweg Verlag Braunschweig
Kap. 3, S. 32 - 47

Swan L. W. (1970)

Goose of the Himalayas
Nat. Hist. 79, S. 68 - 75

Weitnauer E. (1983)

<<Mein Vogel>>
Aus dem Leben des Mauerseglers Apus apus
Verlag: Basellandschaftlicher Natur - und Vogelschutz-
verband, 2 Auflage

Winnegard H. M., Toennis G., Block R. J. (1948)

Detection of sulfur - containing amino acids on
paper chromatograms
Science 108, S. 506

Wolters H. E. (1975 - 1982)

Die Vogelarten der Erde
Verlag Paul Parey Hamburg, Berlin

Zimmermann C. L., Pisano J. J. (1977)

High Performancy Liquid - Chromatography of Amino
Acid Derivatives
Methode Enzymol. 47, S. 45 - 51

Die vorliegende Arbeit wurde am Max - Planck - Institut für Biochemie in Martinsried von April 1986 bis April 1988 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer danke ich für die großzügige Unterstützung und Förderung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. J. Kösters danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit.

Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. D. Schneegans und Herrn Dr. F. Grimm für die Bereitstellung des Blutes.

Herzlichst danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung Proteinchemie für wertvolle Diskussionen und Hilfestellungen.

Der Max - Planck - Gesellschaft danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Lebenslauf

Reinhard Nothum

9.05.1957	geboren in Warjasch, Region Banat (Rumänien), als Sohn der Eheleute Peter Nothum und Maria - Emilie Nothum (geb. Rothsching)
1964 - 1972	deutschsprachige Volksschule, Warjasch
1972 - 1976	deutschsprachiges Gymnasium, Arad (Rumänien)
Juni 1976	hier Bakkalaureat
1977 - 1978	Ableistung des Wehrdienstes in Oradea (Rumänien)
09.1978 - 06.1981	Studium der Veterinärmedizin am Agro- nomischen Institut Temeschburg (Rumänien)
09.1981	Ausreise in die B.R.D.
Winter 1982	Fortsetzung des Studiums der Veterinär- medizin an der Ludwig - Maximilians - Universität München
November 1985	Abschluß des Studiums mit dem dritten Staatsexamen
Seit April 1986	Arbeit an vorliegender Dissertation am Max - Planck - Institut für Biochemie in Martinsried bei München, Abt. Protein- chemie, Prof. Dr. G. Braunitzer.

